

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

В. М. Степанов

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ



Структура
и функции
белков



В. М. Степанов

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Структура и функции белков

**Под редакцией
академика А.С. Спирина**

**Рекомендовано Государственным
комитетом Российской Федерации
по высшему образованию
в качестве учебника для студентов
высших учебных заведений,
обучающихся по направлению
и специальности "Биология"**



**МОСКВА
"ВЫСШАЯ ШКОЛА" 1996**

ББК 28.070

С 79

УДК 577.2

Федеральная целевая программа
книгоиздания России

Издание осуществлено при поддержке Российского фонда
фундаментальных исследований по проекту 95-04-28700

Рецензенты:

кафедра биохимии Московского государственного университета им.
М.В. Ломоносова (зав. кафедрой – проф. А.Д. Виноградов);
проф. Ю.П. Винецкий (Государственный научно-исследовательский ин-т
генетики и селекции промышленных микроорганизмов)

Степанов В.М.

С79 Молекулярная биология. Структура и функции белков: Учеб.
для биол. спец. вузов/Под ред. А.С.Спирина. — М.: Высш. шк.,
1996. — 335 с.: ил.

ISBN 5-06-002573-X

Книга завершает ряд учебников по теме "Молекулярная биология" ("Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка" – 1986 г.; "Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот" – 1989 г.). В ней рассмотрены основные черты строения и функционирования белков, все уровни организации структуры этих биополимеров. Обсуждены особенности функционирования важнейших типов белков – ферментов, транспортных, фибриллярных; кратко рассмотрены свойства аминокислот и пептидов, реакции посттрансляционной модификации.

С 1903010000 + 054
001(01) – 96 50-96

ББК 28.070

Б7А

ISBN 5-06-002573-X

© В.М.Степанов, 1996

ПРЕДИСЛОВИЕ

Предлагаемая вниманию читателя книга представляет собой учебник, рассчитанный прежде всего на тех, кто, приступая к изучению молекулярной биологии, хотел бы систематизировать знания о строении и функциональных свойствах белка. Построение материала в известном смысле традиционно — после вводных глав, в которых кратко излагаются сведения об аминокислотах и пептидах, а также о выделении и первичной характеристике белков, рассматриваются основные уровни организации их структуры, реакции модификации, которым они подвергаются в биологических системах. Обсуждению функциональных свойств белков посвящено несколько отдельных глав. Выбор тех или иных групп белков для рассмотрения диктовался прежде всего необходимостью познакомить читателя с белками, исследование которых служило и еще продолжает служить фактической основой для выработки концепций этой отрасли науки. Понятно, впрочем, что в рамках учебника было невозможно, да и вряд ли нужно давать описание хотя бы основных групп белков.

Автор счел бы свою задачу выполненной, если бы читатель смог на относительно небольшом материале получить представление об основных результатах исследования белков и возникающих новых проблемах. Учебник составлен на основе лекционного курса, читаемого автором на биологическом факультете Московского государственного университета для студентов, специализирующихся по молекулярной биологии и вирусологии, и близок к курсу, читаемому на химическом факультете МГУ. От читателя потребуются, безусловно, знания основ биохимии и органической химии, однако пробелы в них, если они обнаружатся, могут быть легко восполнены с помощью общих руководств, а также рекомендуемой литературы, которая послужит также более углубленному изучению тех или иных вопросов.

Можно надеяться, что книга будет полезной не только для студентов и аспирантов, но и для научных сотрудников, которые соприкасаются в своей работе с проблемами молекулярной биологии, в частности с белками.

Предлагаемая вниманию читателя книга является частью учебника по молекулярной биологии, издаваемого под редакцией акад. А.С.Спирина. С благодарностью отмечая его инициативу в написании учебника, автор считает необходимым отдать долг памяти профессору Вадиму Олеговичу Шпикитеру, который участвовал в обдумывании плана книги. Автор глубоко благодарен своим сотрудникам и друзьям, практический опыт и взгляды которых сыграли неоценимую роль в формировании представлений о белке, изложенных в этой книге.

В.М.Степанов

Изучение белков имеет давнюю традицию, богатую и исполненную драматизма, однако современные представления об их строении сформировались лишь за последние четыре десятилетия. Заметим, что, несмотря на крупные результаты и исключительно быстрый технический прогресс, закономерности организации этих биологических макромолекул никак нельзя считать полностью познанными. К числу ключевых проблем исследования белка относится прежде всего выяснение правил, управляющих формированием его пространственной структуры, свертыванием полипептидной цепи. Можно думать, что немало нового скрыто в динамике белковой структуры. И все же, видимо, центральная роль принадлежит анализу функции белков.

Еще не так давно способность выступать в качестве биологических катализаторов представлялась настолько значимой особенностью белков, что их иные функции невольно отодвигались в тень и выглядели если не второстепенными, то во всяком случае нетипичными, маргинальными. Бесспорно, в таком подходе отражались как состояние знаний, свойственное совсем недавнему времени, так и действительно выдающееся значение биологического катализа. Нет также сомнения в том, что анализ соотношения строения и функциональных свойств ферментов до сих пор остается чрезвычайно важным и очень продуктивным направлением исследований. И все же нельзя не заметить, что результаты последних лет выявили множество новых аспектов функционирования белков как регуляторов биологических процессов — не только обмена веществ, но также роста и развития — как участников системы коммуникаций, которые объединяют биологические молекулы, органеллы, клетки, ткани, органы в единую управляемую систему. По существу, открылся новый мир белков, и необходимо не только их описание, но и понимание способов действия столь разнообразных молекул.

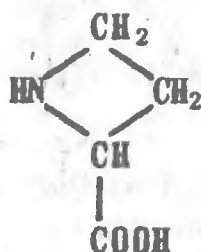
Функция белка всегда индивидуальна, однако могут быть выделены некоторые общие принципы молекулярных механизмов действия белков, поскольку в них заложены такие фундаментальные этапы, как узнавание того или иного партнера, формирование единой структуры комплекса, в которой так или иначе проступают черты взаимодействующих молекул, действие высокоорганизованных ансамблей функцио-

нальных групп, организация микроокружения, глубоко влияющего на природу протекающих химических превращений, передача эффектов внутри молекулы или надмолекулярного комплекса и т.д.

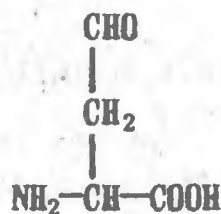
Проблематика химии и биохимии белка изменилась еще и потому, что методический прорыв, связанный с развитием генной и белковой инженерии, открыл не только широкие возможности направленной реконструкции белков, но и показал перспективу создания белковых структур, в том числе и наделенных той или иной функцией *de novo* (с самого начала), не копируя достижения природы, а конструируя их заново. Разумеется, в этом скрыта уникальная возможность глубокой проверки истинности знания, приобретенного трудом нескольких поколений исследователей, и вместе с тем перспектива новых достижений, научную и социальную значимость которых трудно переоценить.

ГЛАВА 1 АМИНОКИСЛОТЫ

α -Аминокислоты — мономеры, из которых построены пептиды и белки. Лишь двадцать аминокислот — так называемые *белковые аминокислоты* — встраиваются в полипептидную цепь в ходе трансляции. В дальнейшем в результате реакций *посттрансляционной модификации* некоторые из них превращаются в другие аминокислотные остатки (например, цистеин — в цистин, серин — в фосфосерин и т.п.). В природе встречается гораздо большее число аминокислот. Например, множество "небелковых" аминокислот содержится в пептидных антибиотиках, синтез которых протекает по нематричному механизму, целый ряд "небелковых" аминокислот участвует в процессах обмена. Таковы, в частности, гомосерин, аргининянтарная кислота, полуальдегид аспарагиновой кислоты — промежуточные продукты биосинтеза белковых аминокислот, азетидинкарбоновая кислота — обычный компонент клеточного сока растений и т.д.



Азетидин-
карбоновая
кислота



Полуальдегид
аспарагиновой
кислоты

В данной главе будут кратко рассмотрены химические свойства белковых α -аминокислот (табл. 1.1). Нередко возникает вопрос, чем обусловлен именно такой набор белковых аминокислот, который выработан в ходе эволюции и универсален для всех ныне живущих организмов. Разумеется, однозначного ответа дать невозможно, тем более что выбор мог диктоваться возможностью биосинтеза той или иной структуры. Однако очевидно, что набор боковых групп белковых аминокислот должен быть достаточно разнообразен.

Аминокислотные остатки с *гидрофобными* цепями различной гео-

метрии позволяют сформировать компактное внутреннее ядро, стабилизирующее структуру белка, организовать гидрофобные контакты с его лигандами. Глицин, лишенный бокового радикала, не заменим при сближении пептидных цепей, обеспечивает их повороты. *Гидрофильные нейтральные аминокислоты* — серин, треонин, аспарагин, глутамин — участвуют в образовании системы водородных связей, обеспечивают гидратацию белка.

Боковые цепи, содержащие *ионогенные* группы (остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот, гистидина, лизина и аргинина), помимо образования водородных связей участвуют в ионных взаимодействиях как внутри белка, так и с другими молекулами. Остатки цистеина открывают возможность участия белка в окислительно-восстановительных процессах, а также служат предшественниками остатков цистина, образуя *дисульфидные мостики* — дополнительные факторы стабилизации белковой структуры.

В то же время нельзя не заметить, что многообразие функциональных групп белковых аминокислот не столь уж велико. Однако их химические возможности резко обогащаются в рамках специфической белковой структуры за счет образования пространственно организованных ансамблей. И все же для многих задач функциональных групп белка недостаточно, для их решения привлекаются специфически связываемые им лиганды — ионы металла, хромофорные группы, коферменты и т.п.

1.1. КИСЛОТНО-ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ

Кислотно-основные свойства аминокислот определяет одновременное присутствие в их структуре *алифатической и карбоксильной групп*, которые, будучи предельно сближены, глубоко влияют друг на друга.

В нейтральной среде, в довольно широком диапазоне pH, α -аминокислоты существуют как *биполярные ионы*, поэтому обычная запись формулы аминокислот, например глицина — $\text{NH}_2\text{—CH}_2\text{—COOH}$, условна. Правильнее было бы писать для нейтральных растворов $\text{NH}_3^+\text{—CH}_2\text{—COO}^-$.

Именно в такой форме биполярных ионов — *цвиттер-ионов* (устаревшее название "бетаиноподобная структура") — аминокислоты существуют в нейтральных растворах и кристаллах. Влияние положительно заряженной аммонийной группы в α -положении делает α -карбоксильную группу значительно более сильной по сравнению с карбоксилем алифатических кислот. Так, если pK_a уксусной кислоты (pH, при котором диссоциация проходит наполовину) составляет 4,7, то у глицина pK_a карбоксила равен 2,34. Примерно такие же величины pK_a свойственны карбоксильным группам других α -аминокислот (табл. 1.1).

**Таблица 1.1. Аминокислоты, включаемые в белки
при трансляции (белковые аминокислоты)**

Название	Сокращенное обозначение	Структура R	pK _a			pI
			α-COOH	α-NH ₃ ⁺	боковой цепи	
Аланин	Ala, A	-CH ₃	2,34	9,69	—	6,01
Аргинин	Arg, R	$ \begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{---}(\text{CH}_2)_3\text{NH---C---NH}_2 \end{array} $	2,17	9,04	12,84	10,76
Аспарагин	Asn, N	-CH ₂ -CO-NH ₂	2,02	8,60	—	5,41
Аспарагиновая кислота	Asp, D	-CH ₂ -COOH	1,88	9,00	3,65	2,77
Цистеин	Cys, C	-CH ₂ -SH	1,71	8,18	10,28	5,02
Глутаминовая кислота	Glu, E	-CH ₂ CH ₂ -COOH	2,16	9,67	4,32	3,24
Глутамин	Gln, Q	-CH ₂ CH ₂ -CO-NH ₂	2,17	9,13	—	5,65
Глицин	Gly, G	-H	2,34	9,60	—	5,97
Гистидин	His, H	$ \begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---C---N---} \\ \qquad \qquad \\ \text{HC} \qquad \qquad \text{CH} \\ \qquad \qquad \diagdown \quad / \\ \qquad \qquad \text{NH} \end{array} $	1,82	9,17	6,00	7,50
Изолейцин	Ile, I	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---CH---CH}_2\text{---CH}_3 \end{array} $	2,36	9,68	—	6,02
Лейцин	Leu, L	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{---CH}_2\text{---CH---} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array} $	2,36	9,60	—	5,98
Лизин	Lys, K	-(CH ₂) ₄ -NH ₂	2,18	9,12	10,53	9,82
Метионин	Met, M	-CH ₂ CH ₂ -S-CH ₃	2,28	9,21	—	5,74
Фенилаланин	Phe, F	-CH ₂ -C ₆ H ₅	1,83	9,13	—	5,48

Название	Сокращенное обозначение	Структура R	pK _a			pI
			α-COOH	α-NH ₃ ⁺	боковой цепи	
Пролин	Pro, P	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2 \quad \quad \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{N} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{H} \end{array} $	1,99	10,6		6,30
Серин	Ser, S	-CH ₂ -OH	2,21	9,15		5,68
Треонин	Thr, T	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH} \\ \\ \text{OH} \end{array} $	2,71	9,62		6,16
Триптофан	Trp, W	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{C} \quad \quad \text{C} \\ \quad \quad \quad \\ \text{HC} \quad \quad \quad \text{C} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{N} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{H} \end{array} $	2,38	9,39		5,89
Тирозин	Tyr, Y	$ \begin{array}{c} \text{CH} = \text{CH} \\ \quad \quad \\ -\text{CH}_2 - \text{C} \quad \quad \text{C} - \text{OH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{CH} \quad \quad \quad \text{CH} \end{array} $	2,20	9,11	10,07	5,66
Валин	Val, V	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	2,32	9,62		5,96

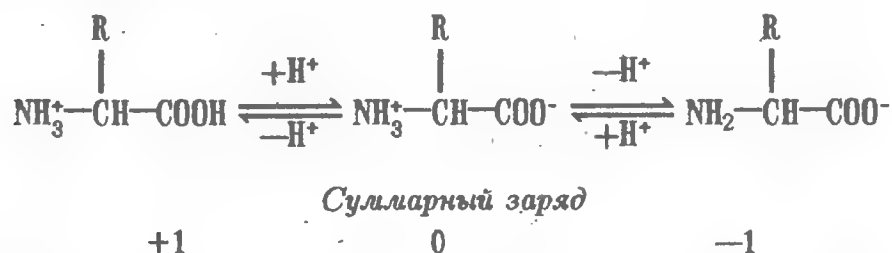
*Структура пролина приведена полностью.

Разумеется, карбоксильные группы, удаленные от α-аммонийной, например β-карбоксил аспарагиновой или γ-карбоксил глутаминовой кислот, не испытывают столь значительного влияния положительного заряда и по своим кислотным свойствам, по способности отдавать и принимать протон приближаются к обычным жирным кислотам.

Точно так же α-аминогруппа в α-аминокислотах испытывает влияние карбоксилат-аниона, присоединенного к тому же углеродному атому, и становится значительно менее основной, чем аминогруппа первичных алифатических аминов — ее pK_a равен 9,6 — 9,7 в отличие

от 10,7 для этиламина. Влияние карбоксильной группы на свойства аминогруппы, в частности на ее основность, падает по мере возрастания расстояния между ними, поэтому ε-аминогруппа лизина практически не отличима по химическим характеристикам от алифатических аминов, ее pK_a равен 10,5.

Если к нейтральному раствору α-аминокислоты, содержащему биполярные ионы, прибавлять кислоту, увеличивая концентрацию ионов водорода, последние будут присоединяться к карбоксилатным группам, превращая их в незаряженные карбоксильные группы. При этом аминокислота, в которой заряды первоначально были скомпенсированы, приобретет суммарный положительный заряд, в частности в электрическом поле она будет перемещаться к катоду. Напротив, если понижать концентрацию ионов водорода, добавляя щелочь, гидроксильные ионы будут реагировать с α-аммонийными группами, отщепляя протон и переводя их в незаряженные аминогруппы. В результате аминокислота приобретет суммарный отрицательный заряд и в электрическом поле будет перемещаться к аноду:



Значение pH , при котором как аминная, так и карбоксильная группы аминокислоты полностью заряжены и заряды скомпенсированы, называют *изоэлектрической точкой* (pI). Для α-аминокислот, которые не имеют ионогенных групп в боковой цепи, величина pI равна полусумме pK_a α-аминной и α-карбоксильной групп. Если аминокислота содержит дополнительные ионогенные группы, при расчете pI следует учитывать их вклад.

Например, pI аспарагиновой кислоты не может быть близкой к 6, как у моноаминомонокарбоновых кислот, так как при этом pH будет практически полностью диссоциирована ее β-карбоксильная группа и аспарагиновая кислота, следовательно, будет нести суммарный единичный отрицательный заряд. Для его подавления необходимо значительно понизить pH — до 2,77, чтобы протонировать β-карбоксил примерно на 90%, что оставит на этой группе около 0,1 отрицательного заряда. При столь низком pH начнется и протонирование α-карбоксильной группы, которая сохранит около 0,9 отрицательного заряда. В сумме эти заряды скомпенсируют единичный положительный заряд аминогруппы, что и обеспечит изоэлектрическое состояние аспарагиновой

кислоты. Легко видеть, что pI в этом случае близка к среднему арифметическому из pK_a α - и β -карбоксильных групп. То же справедливо и для расчета pI глутаминовой кислоты, равной 3,24. Аналогично, рассчитывая изоэлектрическую точку лизина ($pI = 9,82$), используют среднее из pK_a α - и ϵ -аминогрупп.

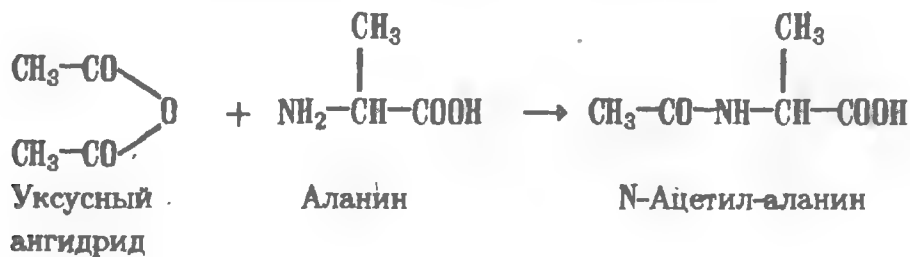
1.2. ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ α -АМИНОКИСЛОТ

Эти реакции разделяют на характерные для α -аминогрупп, α -карбоксильных групп и протекающие с совместным участием обеих функций.

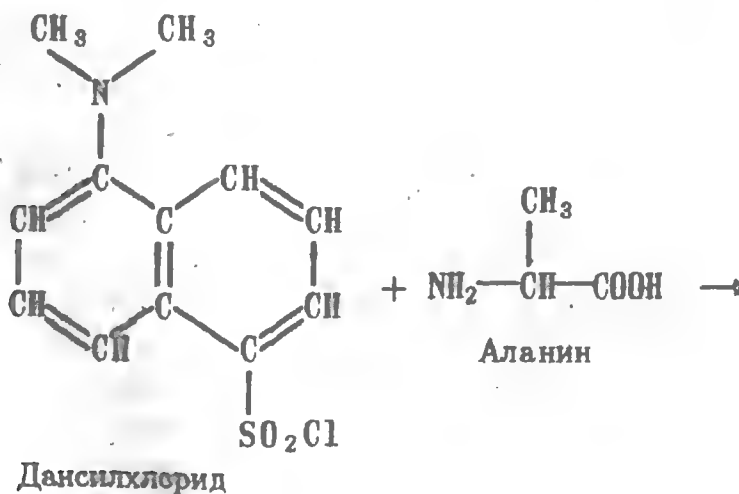
1.2.1. Реакции аминогрупп

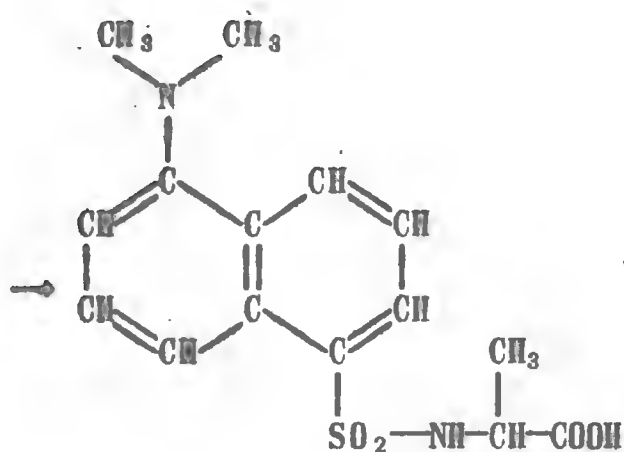
В целом эти реакции аналогичны реакциям алифатических аминов. *Ацилирование* активированными производными кислот в присутствии основания, связывающего выделяющуюся кислоту, протекает достаточно легко. К таким реакциям, например, относят:

— *ацилирование аминокислот уксусным ангидридом*:



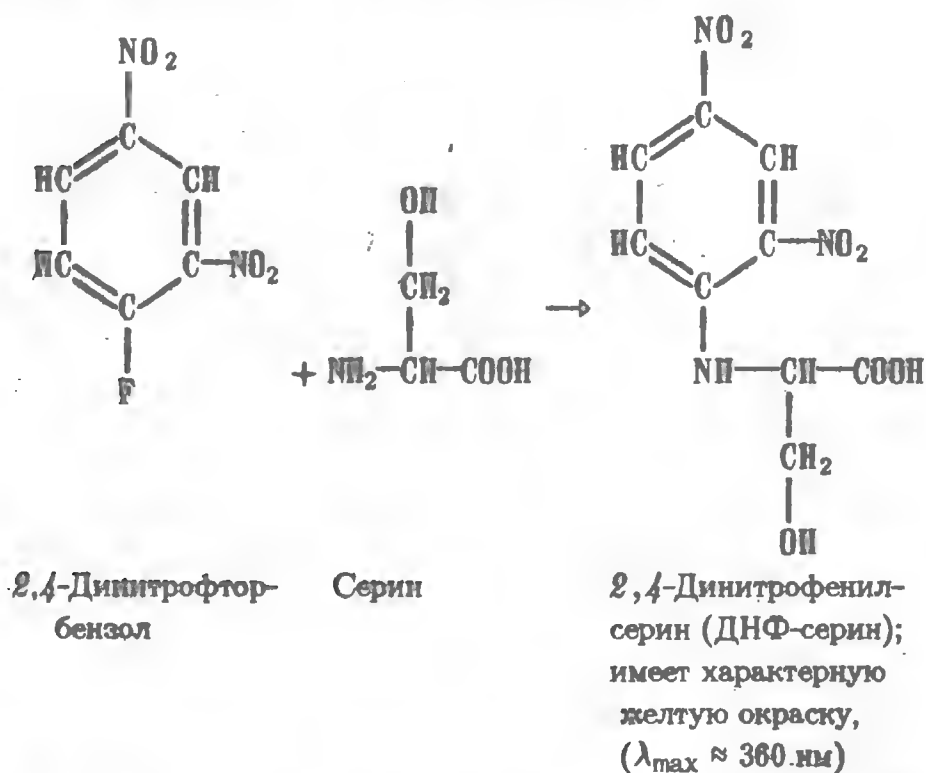
— *реакция с хлорангидридом 5-диметиламинонафталинсульфокислоты (дансилхлоридом) — дансильрование*, — позволяющая превратить аминокислоту во флуоресцирующее соединение:





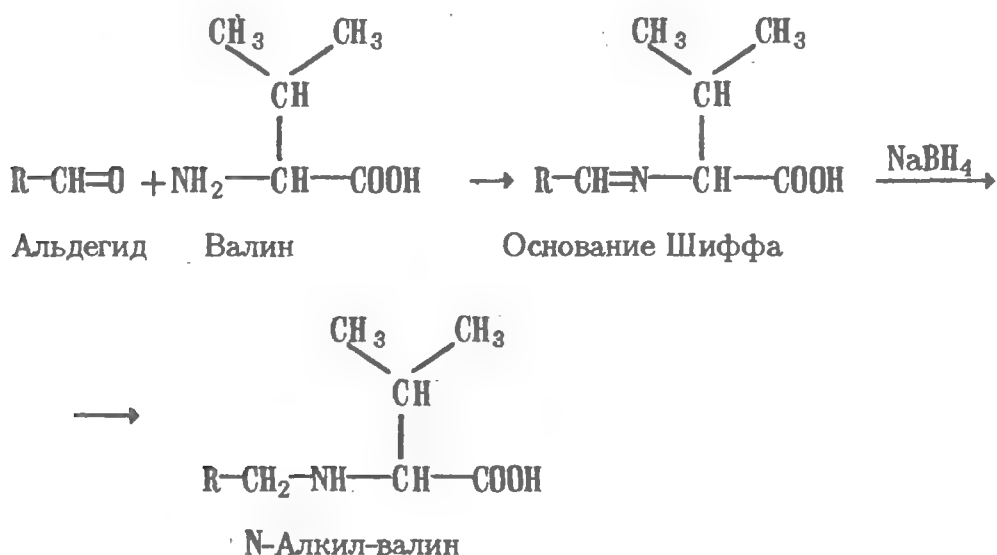
Дансил-аланин

Сходно протекает арилирование весьма активным 1-фтор-2,4-динитробензолом — реакция динитрофенилирования, сыгравшая большую роль в определении структуры пептидов.

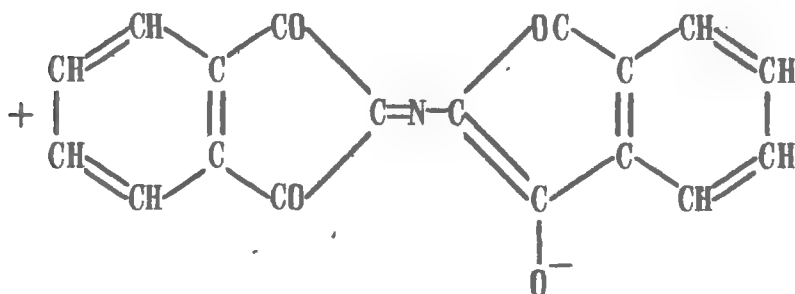
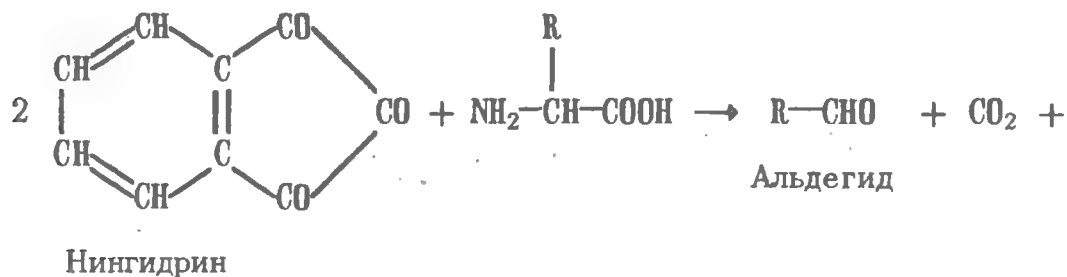


Реакция аминогруппы с альдегидами приводит к образованию не-предельного соединения — так называемого *основания Шиффа*, в котором основность азота существенно понижена. Эта реакция обратима, и в кислой среде альдегид отщепляется с регенерацией аминокислоты. Для основания Шиффа характерна близость двойной связи к асимметрическому центру, что может способствовать рацемизации аминокислоты.

ты за счет миграции двойной связи к α -атому углерода. Гидрирование двойной связи в основании Шиффа, например боргидридом натрия, стабилизирует связь C—N:

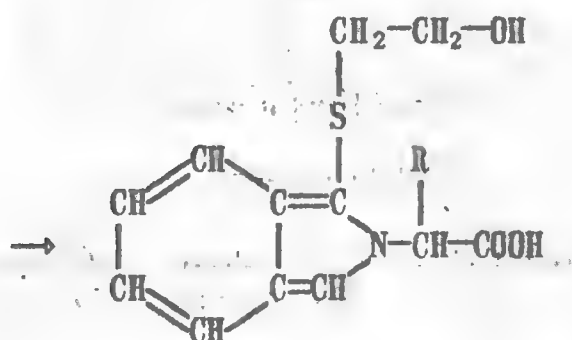
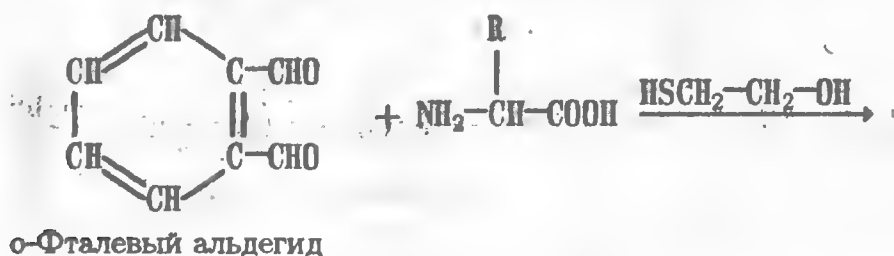


К аналитически важным реакциям с карбонильными соединениями относят взаимодействие аминокислот с *трикетогидринденгидратом* (нингидрином):



На этой реакции основано как качественное, так и количественное определение аминокислот (в том числе в автоматических анализато-

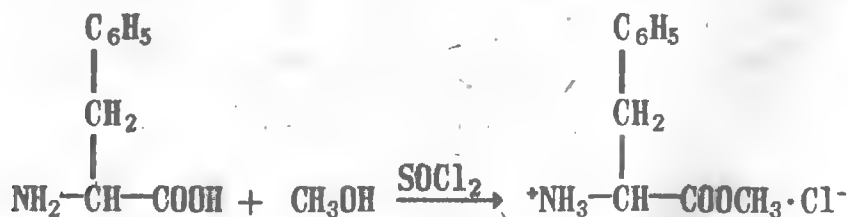
рах).¹ Флуоресцирующие производные образуются при реакции α -аминокислот с *о*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола. Эта реакция позволяет определять очень малые, порядка пикомолей, количества аминокислот:



Продукт реакции, производное
изоиндола; интенсивно флуорес-
цирует $\lambda_{\text{max}} = 455 \text{ нм}$ (λ_{max}
возбуждения равна 360 нм)

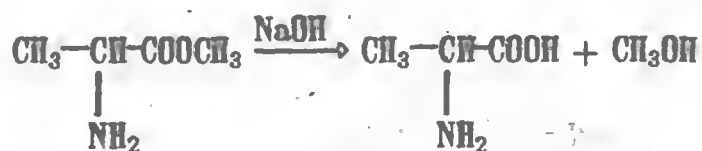
1.2.2. Реакции карбоксильных групп

Эти реакции аминокислот в определенной мере соответствуют реакциям алифатических карбоновых кислот. Этерификация протекает в безводных спиртах в присутствии кислотных катализаторов. Так, фенилаланин этерифицируется почти количественно в безводном метаноле в присутствии соляной кислоты или (лучше) тионилхлорида:

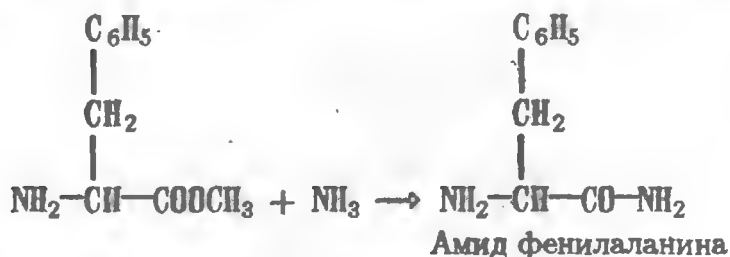


Метиловый эфир фенил-
аланина (хлоргидрат)

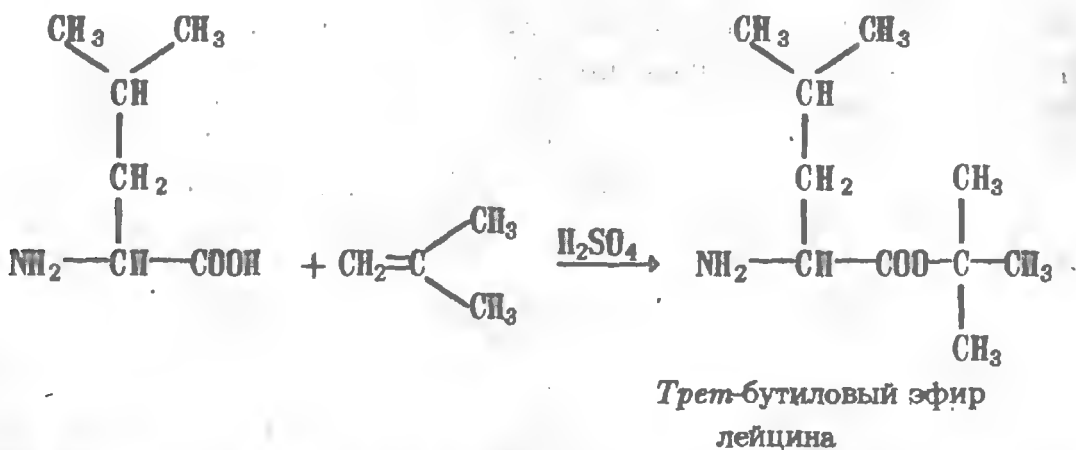
Эфиры аминокислот — важные исходные вещества для пептидного синтеза — могут гидролизоваться, в особенности в щелочной среде (реакция омыления):



Обработка эфиров аминокислот безводным аммиаком превращает их в амиды:



Для временной защиты α -карбоксильных групп, необходимой при пептидном синтезе, их превращают в трет-бутиловые эфиры путем реакции с изобутиленом в присутствии серной кислоты:

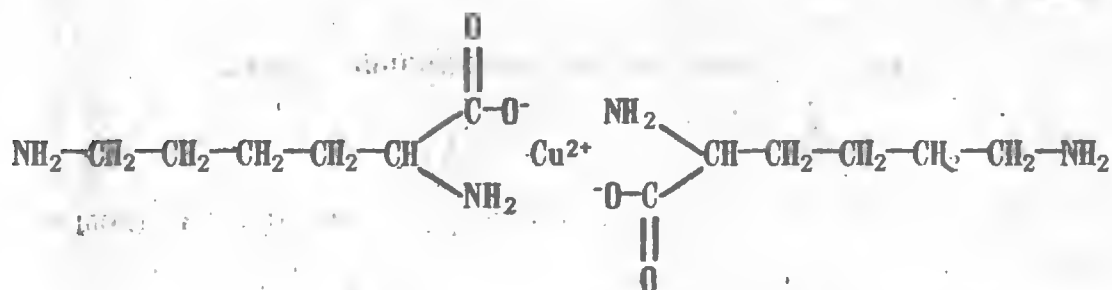


Такие эфиры устойчивы в слабощелочных средах, но избирательно расщепляются кислотами с регенерацией свободной карбоксильной группой.

1.2.3. Реакции с совместным участием α -аминой и α -карбоксильной групп

Соли аминокислот с некоторыми ионами металлов, в частности с ионами двухвалентной меди, никеля, кобальта, образуются при участии как карбоксилат-иона (ионная связь), так и аминогруппы (координационная связь), причем возникают весьма устойчивые бицикличе-

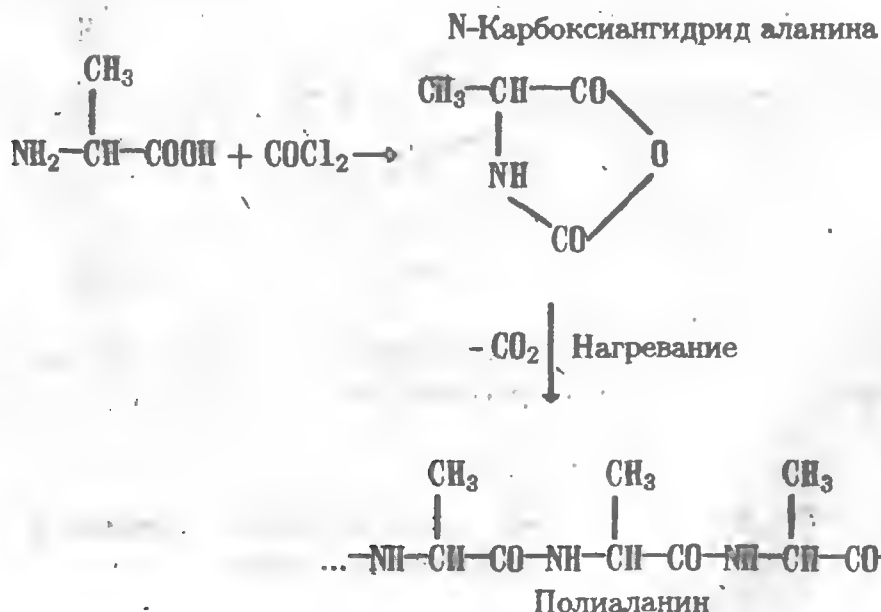
ские (хелатные, или хелатные) структуры, в которых ион металла координирован с двумя молекулами аминокислоты, например



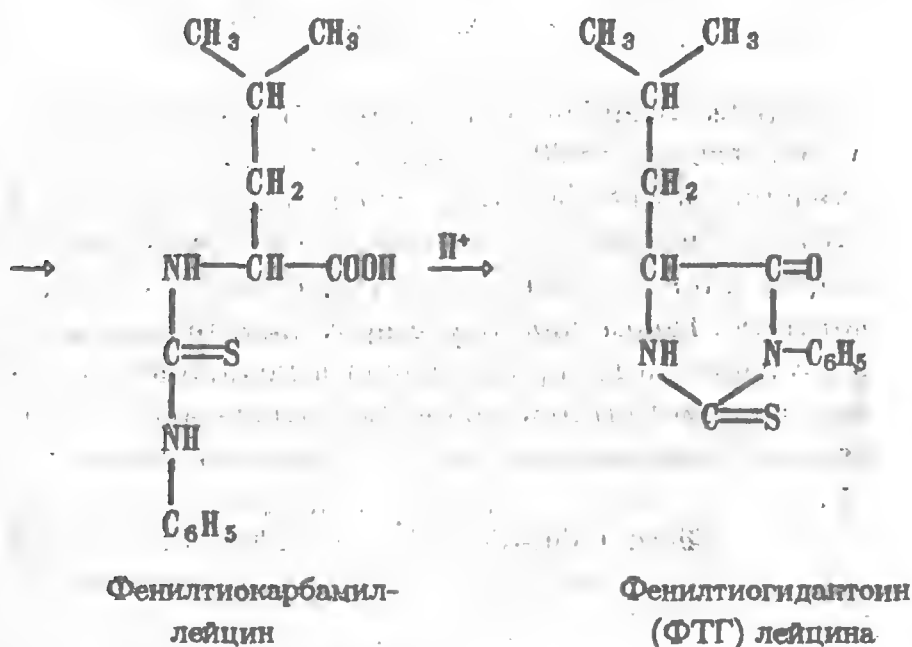
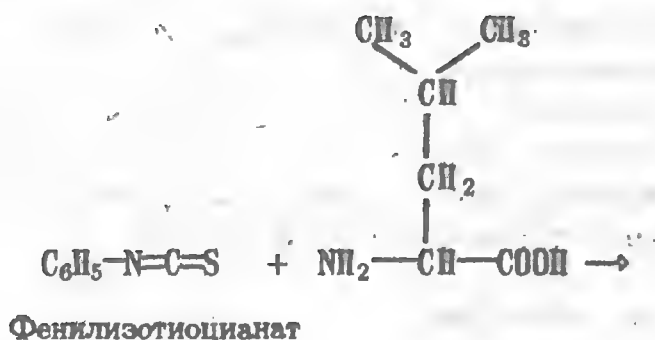
Медная соль лизина, в образовании которой участвуют карбоксильная и аминная группа при α -углеродном атоме. ϵ -Аминогруппа в комплекс не входит и остается свободной, что может быть использовано для проведения реакций, специфически затрагивающих только удаленную аминокислотную группу.

Такие комплексы интенсивно окрашены, например комплексы меди с аминокислотами — в фиолетово-голубой цвет.

Известны реакции, переводящие аминокислоты с участием как аминной, так и карбоксильной групп в циклические структуры. Так, фосген превращает α -аминокислоты в так называемые *N*-карбоксиангидриды, легко полимеризующиеся с отщеплением CO_2 и образованием полиаминокислот:



Очень важна реакция аминокислот с *фенилизотиоцианатом*, которая сначала приводит к производному по α -аминогруппе — *фенилтиокарбамил-аминокислоте*:



Фенилтиокарбаминаминокислоты и некоторые их аналоги интенсивно поглощают в ультрафиолетовом свете, что используют при количественном определении аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Обработка кислотами приводит к внутримолекулярной циклизации фенилтиокарбаминаминокислоты с образованием фенилтиогидантоина.

Эти производные аминокислот играют важную роль в анализе первичной структуры белка.

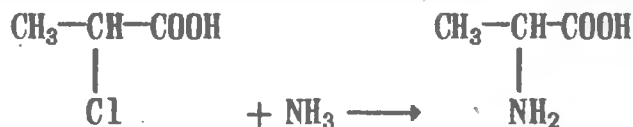
1.3. МЕТОДЫ СИНТЕЗА α -АМИНОКИСЛОТ

1.3.1. Химический синтез

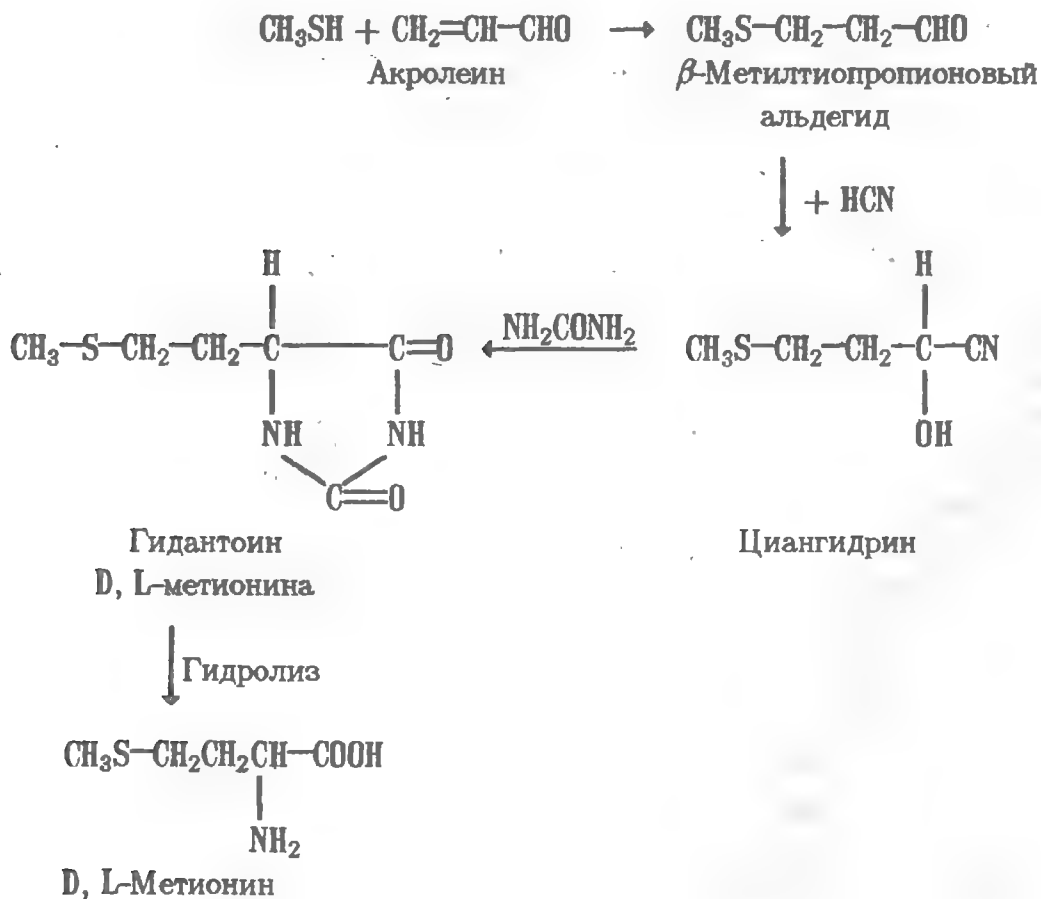
Методы химического синтеза аминокислот весьма разнообразны. Многие из них нашли применение в промышленном производстве аминокислот, используемых в качестве добавок к кормам для сельскохозяйственных животных, а также в медицине. Рассмотрим лишь глав-

нейшие, не останавливаясь на тех методах, которые позволяют получать лишь одну аминокислоту.

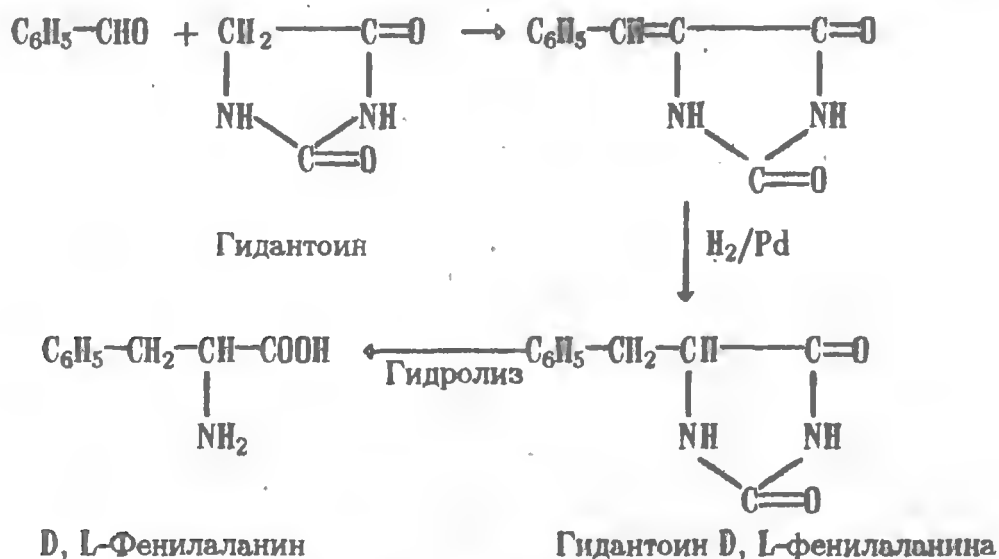
Простейшие аминокислоты можно получать *аминолизом α-галогид-карбоновых кислот*, например аланин — обработкой хлорпропионовой кислоты очень большим избытком аммиака, чтобы подавить побочную реакцию образования иминодикарбоновой кислоты:



Синтез, предложенный еще в прошлом веке А.Штреккером, основан на реакции альдегида $\text{R}-\text{CHO}$ с *цианидом* калия и солями аммония, причем последние можно заменить мочевиной. Получающийся в последнем случае замещенный *гидантоин* (циклическое производное соответствующей аминокислоты) далее гидролизуют щелочью, получая D, L-аминокислоту. Таким способом в промышленности синтезируют D, L-метионин (аминокислоту, применяемую в медицине и в животноводстве), исходя из β-метилтиопропионового альдегида, в свою очередь образующегося по реакции акролеина и метилмеркаптана.



Альдегиды можно вводить в реакцию с заранее полученным гидантоином. Последующее гидрирование двойной связи и гидролиз приводят к получению рацемата соответствующей аминокислоты:



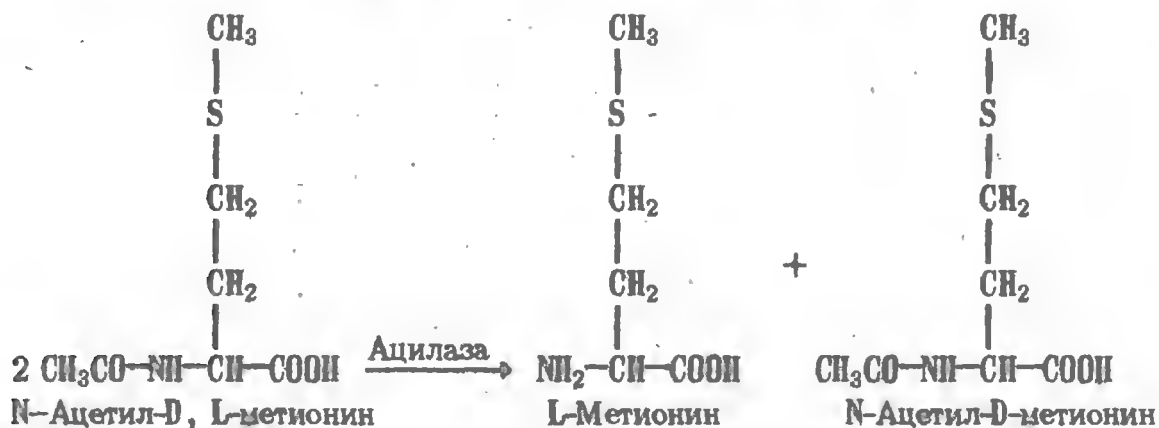
1.3.2. Разделение рацемических аминокислот

Как бы ни протекал химический синтез, он приводит к образованию смеси строго одинаковых количеств L- и D-изомеров аминокислоты — к ее рацемату. Практический интерес имеют, как правило, природные L-изомеры, поэтому важны способы разделения рацематов, позволяющие выделить L-изомеры. Химические методы разделения основаны на *взаимодействии рацемических аминокислот или их производных с асимметрическими соединениями*.

Так, прибегают к получению солей эфиров аминокислот с заранее полученным стереоизомером аминокислоты, например с L-глутаминовой кислотой, ацилированной L-аминокислотой или какой-то другой асимметрической кислотой, в частности D-винной. Образующиеся диастереомерные соли обладают, как правило, разной растворимостью. Соль эфира L-изомера разделяемой аминокислоты с D-винной кислотой по растворимости отличается от соли, построенной из эфира D-аминокислоты и D-винной кислоты. Это открывает возможность выделения изомеров дробной кристаллизацией. Сложность этого пути очевидна, поэтому к нему прибегают лишь в тех случаях, когда иные подходы не дают результата.

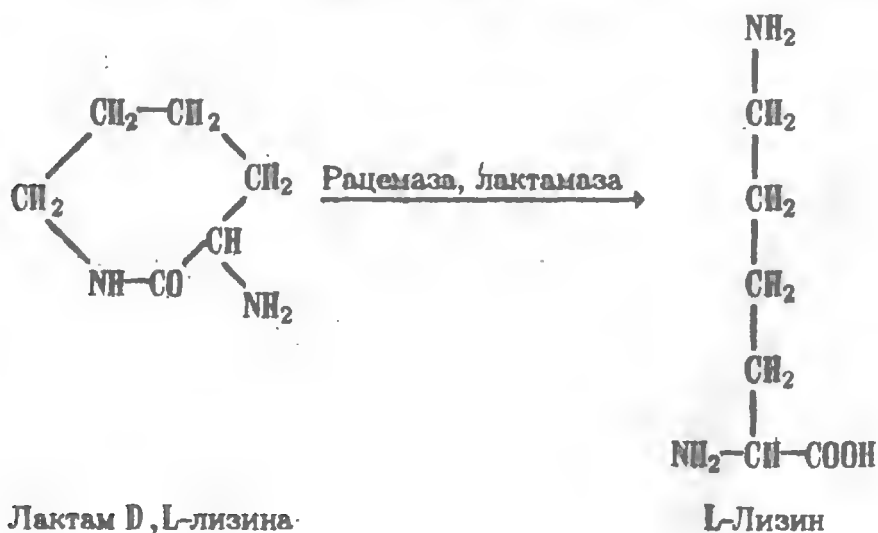
Наибольшее распространение получил *ферментативный способ разделения рацематов аминокислот*. Чаще всего используют способность фермента *ацилазы L-аминокислот*, содержащейся в почках животных или продуцируемой некоторыми микроскопическими грибами,

избирательно гидролизовать N-ацил-L-аминокислоты, не затрагивая D-изомеров. После исчерпывающего гидролиза ацилированной (чаще ацетилированной) аминокислоты в присутствии ацилазы образуется смесь свободной L-аминокислоты и ацетил-D-аминокислоты, которые легко разделяются кристаллизацией или ионным обменом:



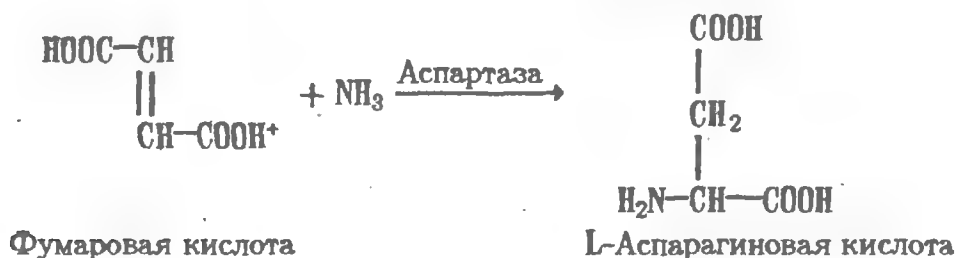
Как правило, после разделения проводят рацемизацию ацетил-D-аминокислоты, а образовавшийся рацемат вновь гидролизуют ацилазой, достигая в конечном счете практически полного превращения ацетил-D,L-аминокислоты в L-аминокислоту.

Интересно превращение рацемического лактама D,L-лизина (получаемого из доступного исходного соединения — капролактама) в L-лизин за счет совместного действия двух ферментов. Один из них — L-лизинлактамаза — гидролизует с образованием L-лизина только L-изомер лактама, другой же рацемизаза — превращает нерасщепленный лактам D-изомера в рацемический лактам D,L-лизина. L-Изомер вновь гидролизуется лактамазой. Итогом является полное превращение лактама D,L-лизина в L-лизин, применяемый в качестве кормовой добавки:

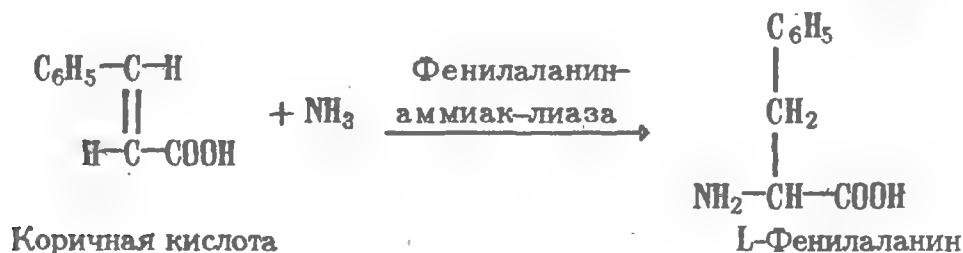


1.3.3. Ферментативный синтез аминокислот

Практически удобны способы получения аминокислот путем катализируемого специфическими ферментами превращения соединений-предшественников. При этом фермент обеспечивает стереоспецифичность реакции, образование только одного, как правило, L-изомера. Широко распространен синтез L-аспарагиновой кислоты путем присоединения аммиака к фумаровой кислоте, который катализируется аспартазой или микробными клетками, содержащими этот фермент:



Для получения L-фенилаланина применяют реакцию коричной кислоты и аммиака, катализируемую фенилаланин-аммиак-лиазой:



1.3.4. Микробиологический синтез аминокислот

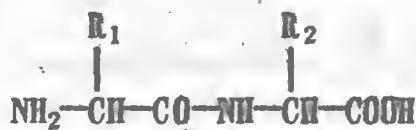
Способ основан на образовании свободных аминокислот некоторыми микроорганизмами из простого сырья — отходов сахарной промышленности, крахмала, ацетата и т.п. Используют мутанты микроорганизмов, утратившие некоторые ферменты разветвленного пути биосинтеза аминокислот, что приводит к усиленному образованию других аминокислот. Например, блокирование гомосериндегидрогеназы, ответственной за превращение полуальдегида аспарагиновой кислоты в гомосерин и далее в треонин, метионин, направляет практически весь полуальдегид аспарагиновой кислоты на синтез лизина. Дополнительно вводят мутации, снимающие торможение активности ферментов конечным продуктом цепи реакций, например лизином; иногда прибегают к

умножению числа генов, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза данной аминокислоты.

Сочетание этих приемов позволило получить мутанты, способные, например, синтезировать до 100 г L-лизина на 1 л культуральной жидкости при высокой степени конверсии исходных веществ в аминокислоту. Микробиологические, химические и отчасти ферментативные методы синтеза аминокислот положены в основу их промышленного производства, достигающего сотен и десятков тысяч тонн в год (лизин, глутаминовая кислота, фенилаланин, аспарагиновая кислота, метионин). Эти аминокислоты применяют как добавки к кормам, вкусовые добавки, лекарственные препараты, исходные вещества для получения физиологически активных пептидов.

ГЛАВА 2 ПЕПТИДЫ

Если карбоксильная группа одной α-аминокислоты ацилирует аминогруппу другой аминокислоты, то образующуюся амидную связь называют пептидной, а само соединение — пептидом:



Пептидная связь

Таким образом, пептиды представляют собой соединения, которые построены из остатков α-аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Иногда для достаточно длинных пептидов применяют термин полипептиды. Заметим, что с участием аминокислот могут образовываться и другие амидные связи, например между γ-карбоксильной группой остатка глутаминовой кислоты и ε-аминогруппой лизина при сшивании цепей фибрина в ходе старения тромба. Такие связи, химически близкие пептидным, к последним не причисляют, иногда называют их изопептидными.

Образование пептидных связей в воде термодинамически невыгодно, этим обусловлена необходимость предварительной активации взаимодействующих групп (чаще — карбоксильной группы) при химическом синтезе пептидной связи, а также при ее биосинтезе. Однако кинетически пептидная связь достаточно стабильна и ее гидролитическое расщепление происходит лишь при использовании химических

катализаторов (кислот или щелочей) либо при катализе специфическими ферментами (пептидазами)

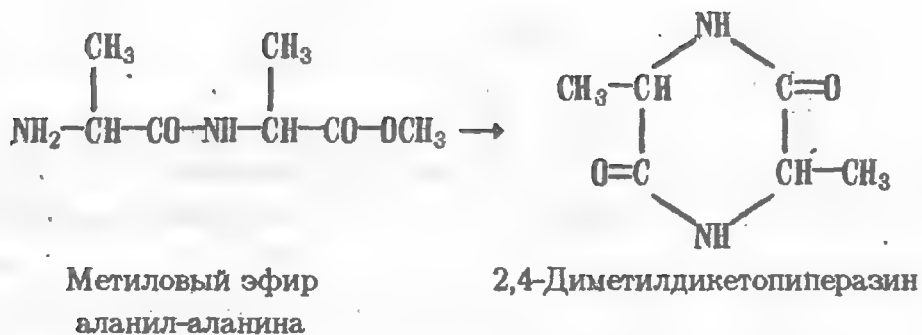
Понятно, что в дипептиде, полученном конденсацией двух аминокислотных остатков, сохраняются как карбоксильная, так и аминная группы, поэтому присоединение к нему аминокислотных остатков может быть продолжено с обеих сторон, что открывает возможность образования очень длинных — в несколько сотен и даже тысяч аминокислотных остатков — пептидных цепей. В пептидной цепи различают *N*-концевой (или *аминоконцевой*) остаток, содержащий свободную аминогруппу, и *C*-концевой остаток, который несет свободную α -карбоксильную группу.

2.1. ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДОВ

Подобно аминокислотам, пептиды, содержащие свободные аминную и карбоксильную группы, являются *биполярными ионами* и имеют изoeлектрическую точку. Их растворимость в воде весьма различна и определяется как длиной пептида, так и природой образующих его аминокислот. Кисотно-основные свойства пептидов несколько отличаются от свойств аминокислот, поскольку взаимное влияние аминной и карбоксильной групп в них значительно слабее, чем в α -аминокислотах, а в длинных пептидах им вообще можно пренебречь. В пептидах pK_a α -карбоксильной группы заметно выше, чем в аминокислотах, и составляет, например, для аланил-аланина 3,12 (ср. с pK_a 2,34 для карбоксила аланина и 4,7 для уксусной кислоты). Для карбоксильной группы аланил-аланил-аланина $pK_a = 3,39$; с дальнейшим ростом цепи сохраняется значение, близкое к 3,4.

Некоторое повышение кислотности по сравнению с карбоксилем уксусной кислоты следует приписать влиянию соседней пептидной связи. Аналогично α -аминогруппа в пептидах становится менее основной, чем в α -аминокислотах: pK_a α -аммонийной группы составляет 9,69 для аланина, 8,30 для аланил-аланина, 8,03 для аланил-аланил-аланина и с дальнейшим удлинением цепи не меняется.

В остальном химические свойства α -аминной и карбоксильной групп пептидов качественно близки свойствам аминокислот. В частности, они вступают в те же реакции, которые были описаны для аминокислот, кроме протекающих с одновременным участием обеих функциональных групп. Такие реакции для пептидов не характерны. Исключением является довольно легкая циклизация эфиров и некоторых других производных дипептидов, в которых активирована α -карбоксильная группа, приводящая к *дикетопиперазинам*:



В сильнощелочных растворах пептиды дают окрашенные комплексы с ионами меди, построенные весьма сложно. На этом основана так называемая *биуретовая реакция*. Разумеется, пептиды могут также вступать в реакции за счет функциональных групп, содержащихся в боковых цепях аминокислот (см. гл. 9).

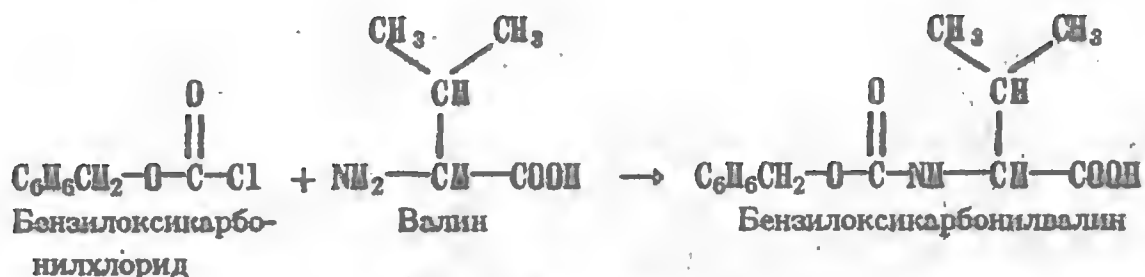
2.2. ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ

Синтез пептидов, основы которого были заложены Э.Фишером в начале столетия, развился в обширную область синтетической органической химии. Описаны синтезы весьма протяженных пептидов и нескольких, пока небольших, белков. Не умаляя значения последних работ, укажем, что для практического получения значительных количеств белка предпочтителен микробиологический синтез в рекомбинантных клетках; начал развиваться и биосинтез пептидов в бесклеточных системах.

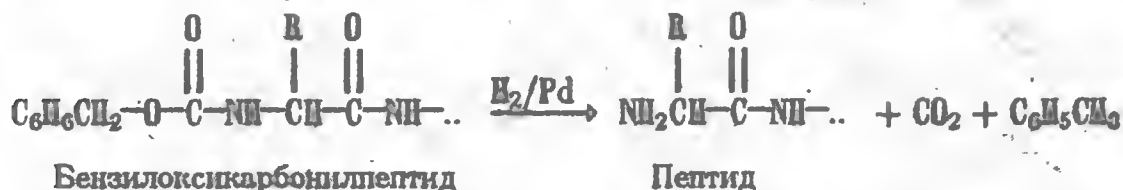
Синтез пептидов определенной структуры, даже наиболее простых, требует предварительного *временного блокирования* (защиты) функциональных групп, которые не должны участвовать в реакции. Если этого не предусмотреть, будут получаться весьма сложные смеси продуктов.

2.2.1. Защита аминогруппы

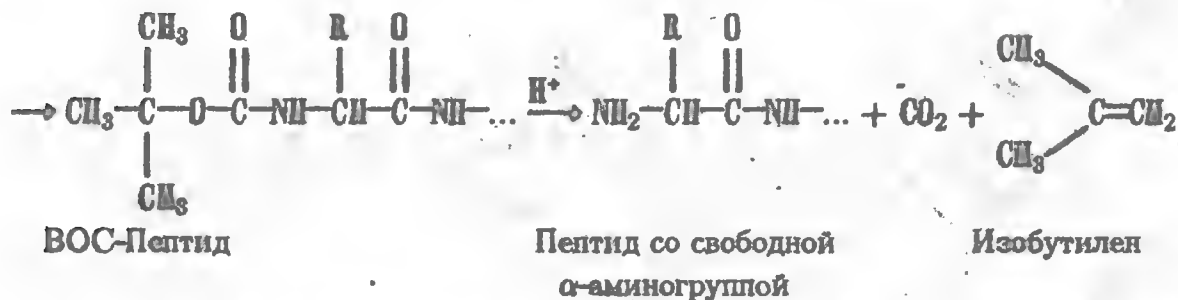
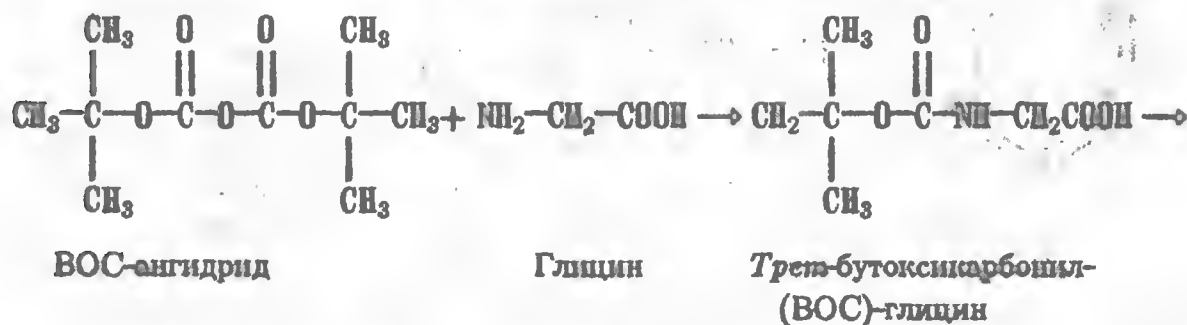
α -Аминогруппу ацилирующей аминокислоты или пептида защищают так, чтобы блокирующую группировку после образования пептидной связи можно было отщепить, снять в достаточно мягких условиях, которые гарантировали бы целостность пептида. Одной из первых была предложена (сохранившая значение до сих пор) *бензилоксикарбонильная* группа (сокращенное обозначение Z, устаревшее название *карбобензоксигруппа*), которую вводят, ацилируя аминокислоту или пептид *бензилоксикарбонилхлоридом*:



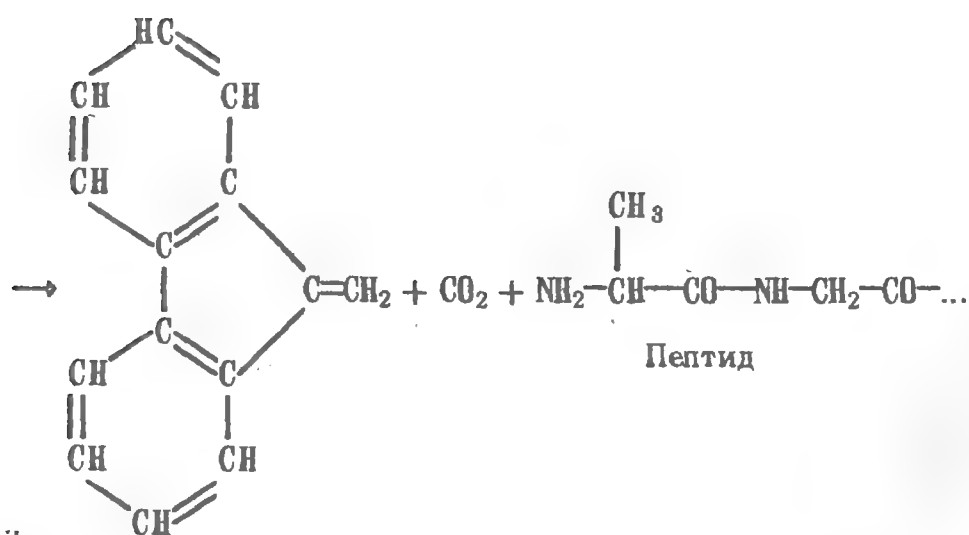
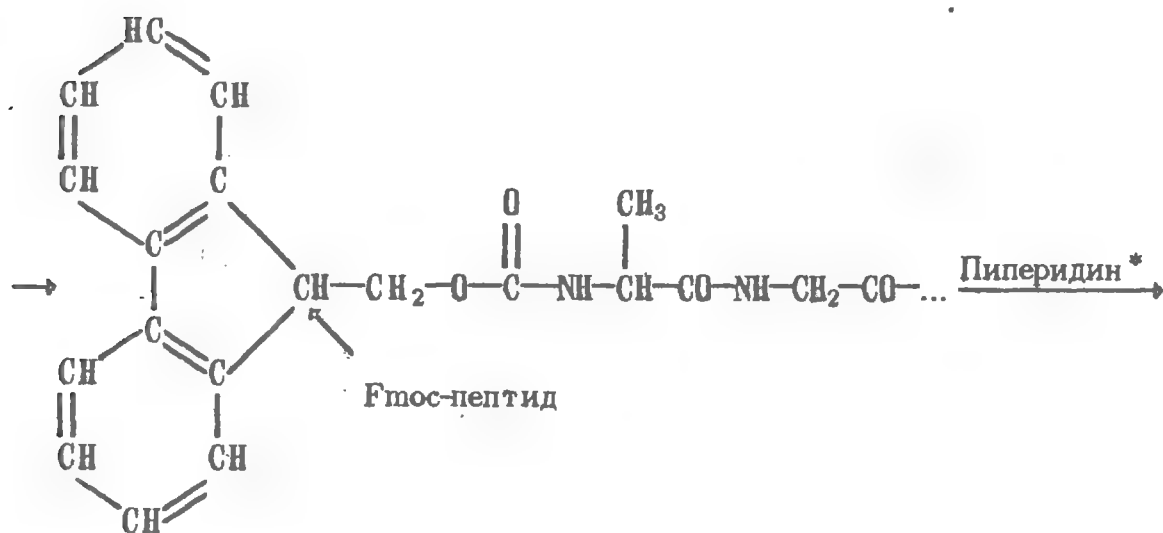
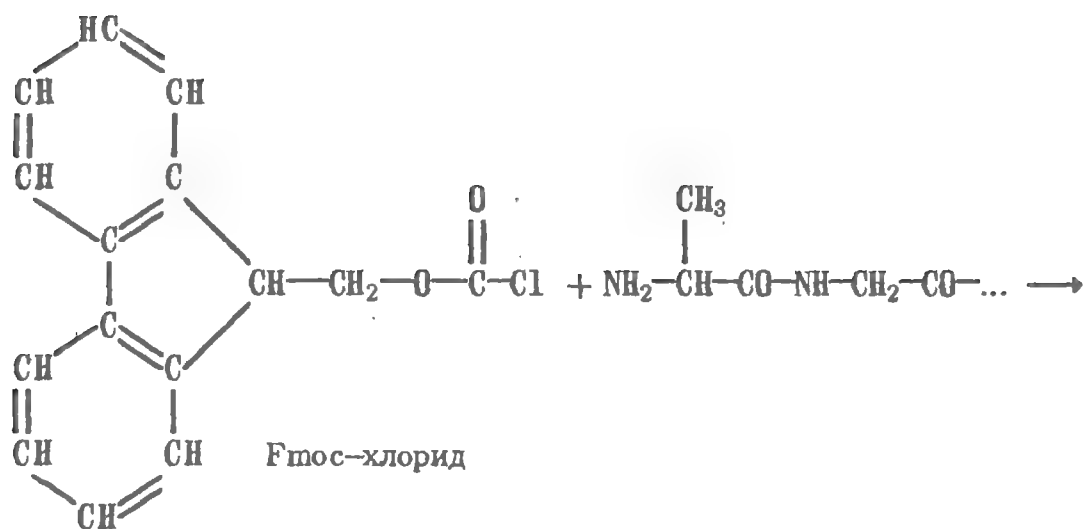
Если надобность в защите миновала, бензилоксикарбонильную группу отщепляют гидрированием в присутствии палладиевого катализатора или действием бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте:



Широко применяют *трет*-бутоксикарбонильную (BOC) группу. Ее вводят, ацилируя аминогруппу ангидридом моно-*трет*-бутилового эфира угольной кислоты (BOC-ангидридом), отщепление же достигается мягким действием кислотных агентов — трифторуксусной кислоты или хлористого водорода в органических растворителях:



В последнее время, особенно в автоматическом синтезе пептидов, все чаще используют 9-флуоренилметилоксикарбонильную группу (Fmoc-группу). Ее вводят, действуя на аминокислоту или пептид соответствующим хлорангидридом:

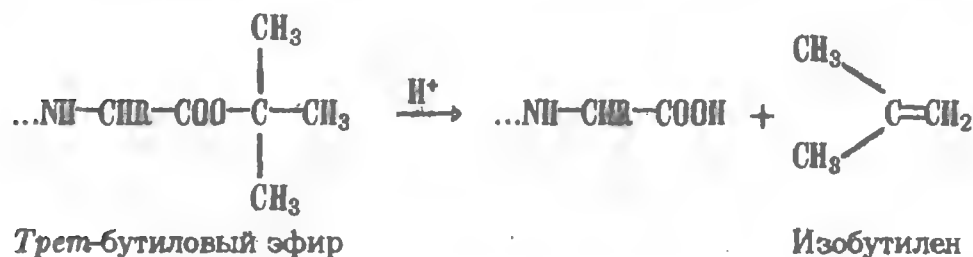


*Вызывает элиминирование водорода, указанного стрелкой.

Известно множество других защитных групп, обладающих теми или иными преимуществами и недостатками и применяемых в различных схемах синтеза. Необходимость использования большого их набора обусловлена тем, что специфические группы требуются для защиты функциональных групп боковых цепей, причем деблокирование α -аминогрупп необходимо проводить каждый раз перед новой стадией синтеза, тогда как защита боковых групп не должна затрагиваться в этих условиях. Их отщепляют в самом конце синтеза пептида.

2.2.2. Защита α -карбоксильной группы

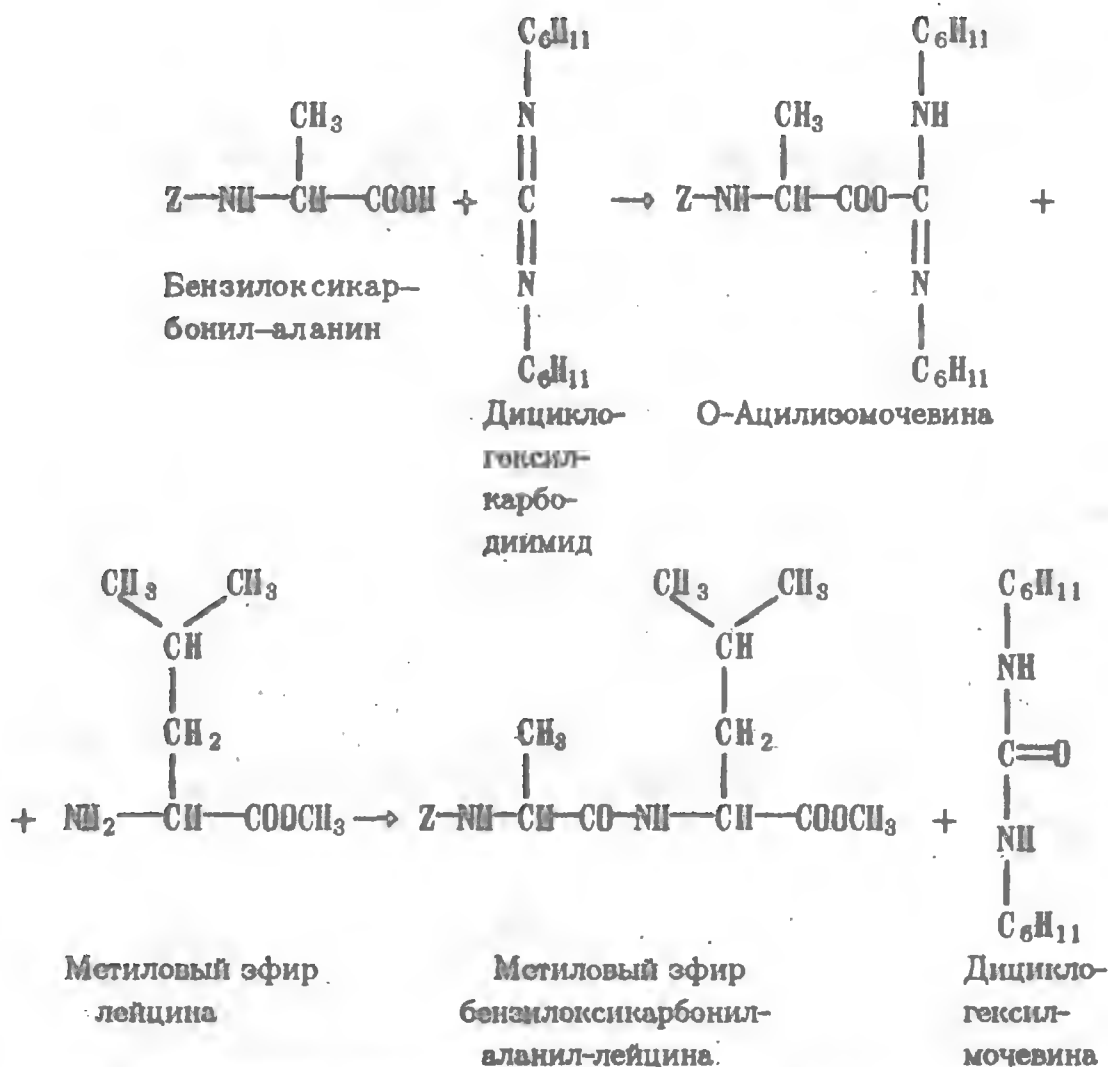
Для этой цели обычно используют превращение карбоксильной группы в метиловый или *трет*-бутиловый эфиры по реакциям, описанным в гл. 1. Для отщепления метилового эфира прибегают к его омылению щелочью, которое не всегда протекает гладко и создает опасность рацемизации C-концевого остатка. *Трет*-бутиловые эфиры удобно расщеплять мягкой обработкой кислотными агентами, например трифторуксусной кислотой:



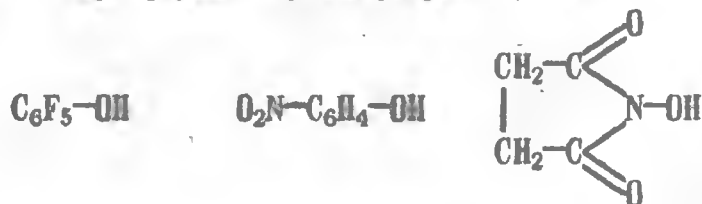
2.2.3. Образование пептидной связи

Для образования пептидной связи, которое при химическом синтезе, как правило, проводят в отсутствие воды, необходима активация карбоксильной группы. Возможна, впрочем, и активация α -аминогруппы, однако ее практически не применяют. Активированное производное защищенной по аминокруппе аминокислоты или пептида может быть получено в отдельной реакции, а иногда и выделено или образовано непосредственно перед конденсацией с аминокомпонентом (аминокислотой или пептидом с защищенной карбоксильной группой).

Реакция в присутствии карбодимидов. Ацилированная аминокислота реагирует с $-\text{N}=\text{C}=\text{N}-$ (карбодимидной)-группировкой, образуя соответствующую *O*-ацилмочевину. Это активированное производное вступает в реакцию с аминокомпонентом, причем образуются пептид и двузамещенная мочевина:

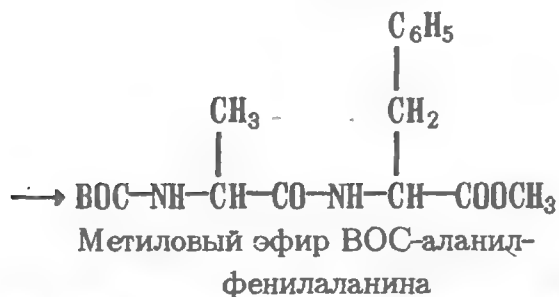
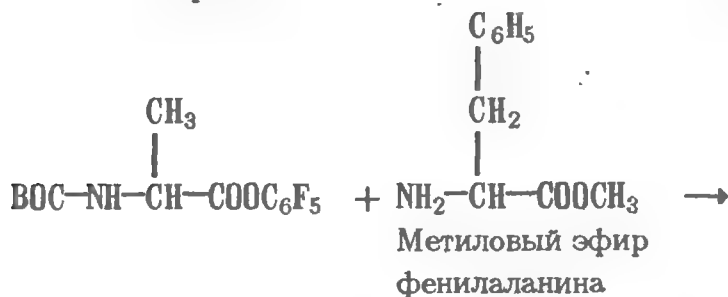
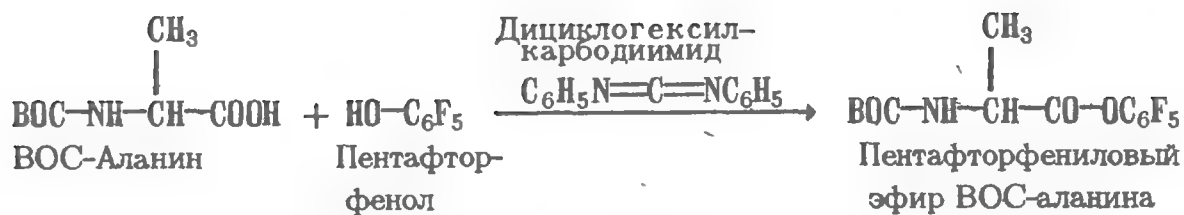


Активированные эфиры. Иногда удобнее превратить О-ацилмочевину в активированный эфир (с некоторым допущением и само это соединение можно рассматривать как активированный эфир; однако оно нестабильно, что может привести к нежелательным побочным реакциям). Для этого к реакционной смеси, содержащей О-ацилмочевину, прибавляют пентафторфенол, *p*-нитрофенол, N-оксисукцинимид и т.п.:

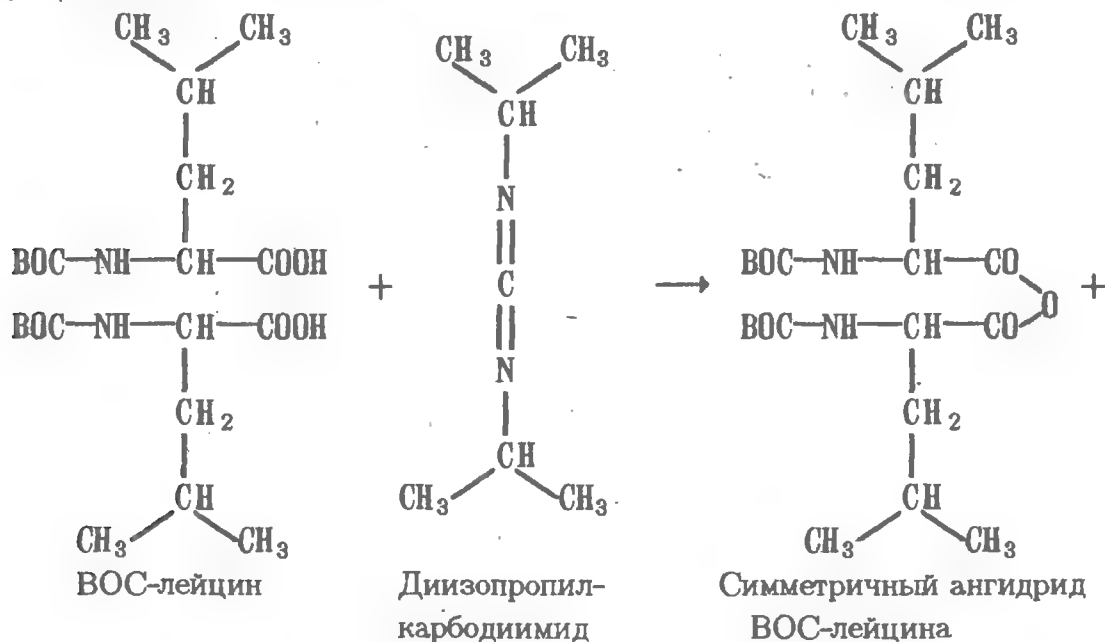


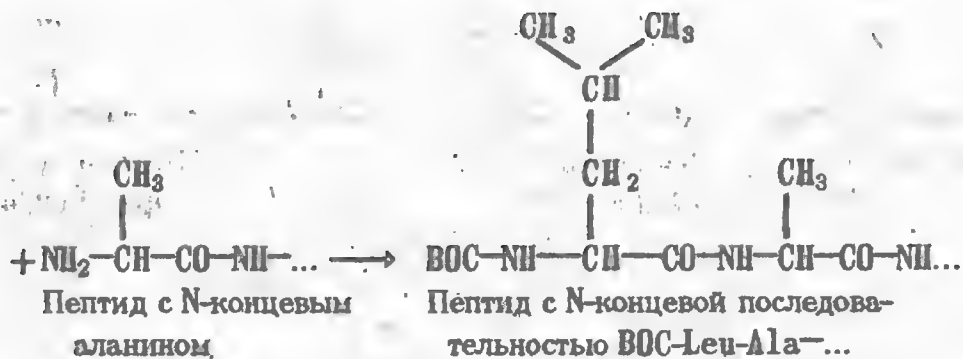
Пентафторфенол *p*-Нитрофенол N-Оксисукцинимид

Продукты переноса аминоксильного или пептидного остатка на оксигруппу этих соединений относительно устойчивы и могут быть выделены. Их взаимодействие с аминоксильным компонентом дает требуемый пептид:



Симметричные ангидриды защищенных аминокислот. О-Ацилмочевина способна реагировать с карбоксильной группой второй молекулы защищенной аминокислоты, образуя ее симметричный ангидрид. Последний является хорошим ацилирующим агентом и реагирует с аминокомпонентом, в результате чего получается пептид и отщепляется защищенная аминокислота:

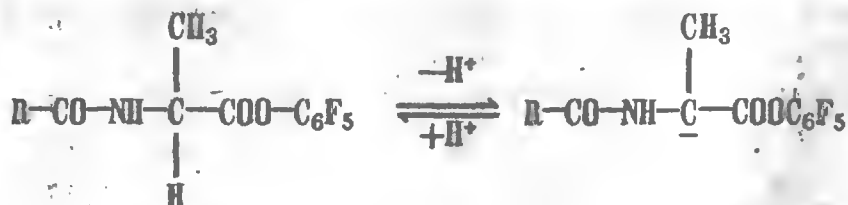




Известно и применяется гораздо большее число способов активации карбоксильных групп; их описание можно найти в специальных руководствах.

2.2.4. Тактика направленного синтеза

Изложенные подходы позволяют проводить направленный синтез весьма сложных пептидов. Оптимальный путь синтеза выбирают исходя из ряда соображений. Особое внимание уделяют предотвращению рацемизации, наиболее вероятной у C_α -атома того остатка, карбоксильная группа которого активирована. Это обусловлено тем, что активирующие группы вызывают смещение электронной плотности не только от углерода карбонильной группы (что необходимо для облегчения атаки этого атома нуклеофильной аминогруппой аминокомпонента), но и от C_α -атома. Последнее благоприятствует отщеплению атома водорода, находящегося при этом углероде, в виде протона. Такое отщепление переводит остающиеся три заместителя у α -атома углерода в плоскую тригональную конфигурацию. При возврате протона, который может подойти к C_α -атому с обеих сторон плоскости, происходит образование равной смеси L- и D-изомеров, т.е. рацемизация. Таким образом, активация карбоксильной группы несет в себе потенциальную опасность рацемизации C-концевых остатков аминокислот в пептидных фрагментах:

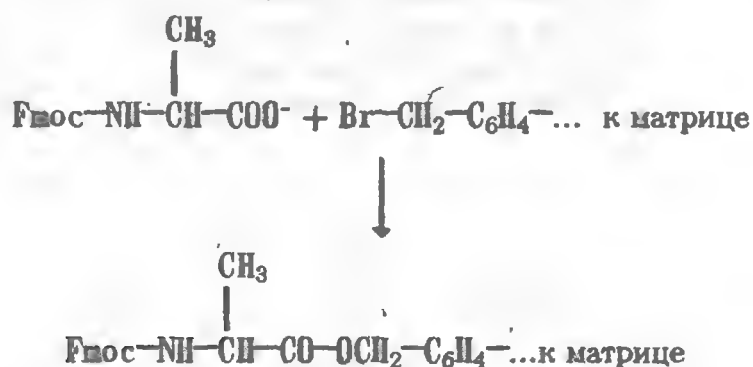


Отщепление и присоединение протона у C_α -атома приводит к рацемизации

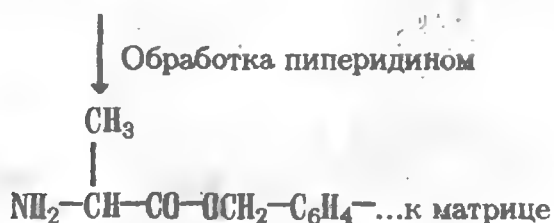
Карбанион, образуемый благодаря активации карбоксильной группы

Амидные связи уретанового типа в бензилоксикарбонил- и ВОС-аминокислотах менее благоприятствуют рацемизации по сравнению с обычными пептидными связями. Следовательно, планируя синтез пептида, выгодно не конденсировать его фрагменты, поскольку для этого пришлось бы активировать карбоксильные группы пептидов, а присоединять к растущему пептиду защищенные активированные аминокислоты одну за другой начиная с С-концевого аминокислотного остатка. Синтез длинных пептидов иногда приходится все же проводить из фрагментов, которые затем соединяют друг с другом. В этом случае стараются выбирать фрагменты так, чтобы в С-концевом положении каждого из них оказывался остаток глицина, который не содержит асимметрического атома и, значит, не может рацемизоваться, или остаток пролина, в котором нет атома водорода при α -углеродном атоме и не может происходить рацемизация по описанному выше механизму. Если такой прием почему-либо невозможен, прибегают к конденсации фрагментов, используя азиды пептидов, — метод, при котором опасность рацемизации минимальна, хотя и не исключена вовсе.

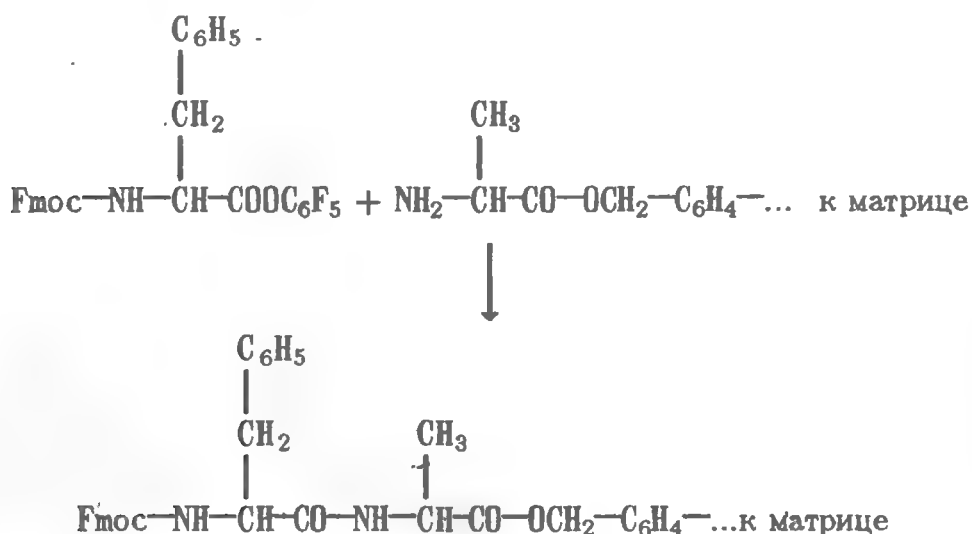
Исключительно ценным развитием ступенчатого синтеза пептидов явился твердофазный метод синтеза пептидов, предложенный Р. Меррифилдом. С-Концевую аминокислоту присоединяют к полимерной матрице сложноэфирной связью, используя, например, реакцию соли аминокислоты с активными бромметильными группами на поверхности поперечно сшитого полистирола:



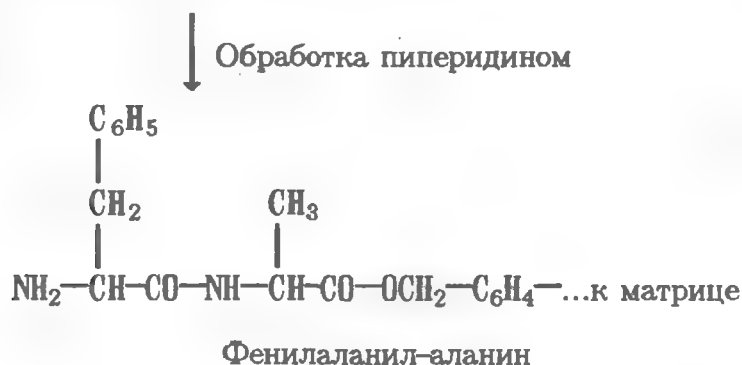
После образования сложноэфирной связи между С-концевым остатком и матрицей отщепляют защитную группу (обычно ВОС или Fmoc), обрабатывая полимер соответственно кислотой или амином:



К освободившейся α-аминогруппе присоединяют аминокислоту, предшествующую С-концевой, используя для этого ангидрид защищенной аминокислоты или иной способ активации — реакцию в присутствии карбодиимида, пентафторфенилового эфира защищенной аминокислоты и т.п.:



Затем снова отщепляют защитную группу



и повторяют цикл, присоединяя следующий аминокислотный остаток, и т.д.

Такие циклы можно повторять много раз, получая весьма длинные пептидные цепи, содержащие до 100 остатков и более. Многостадийный синтез на твердофазном носителе выгоден прежде всего тем, что он позволяет избежать потерь синтезируемого пептида, неминуемых при выделении продукта синтеза в обычных условиях. Выход на стадии присоединения аминокислоты и отщепления защитной группы достигает, как правило, 99 — 99,5%, в частности за счет применения большого избытка ацилирующего компонента. Важно и то, что растущие пептидные цепи, будучи связаны с носителем, защищены от

агрегации — явления, резко ограничивающего возможности синтеза длинных пептидов в растворе.

Твердофазный синтез пептидов, который состоит из строго одинаковых повторяющихся стадий, удалось автоматизировать — были созданы автоматические синтезаторы пептидов.

На практике метод все же ограничен неполнотой присоединения ациламиноокислоты в отдельных циклах. Понятно, что "недостроенный" в том или ином цикле пептид будет ацилирован в следующем, что приведет к пропуску аминокислотного остатка. Образование таких пептидов с ошибочными последовательностями даст при синтезе длинного пептида весьма сложную смесь продуктов. Метод оказался особенно продуктивным в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией, которая позволяет выделить главный компонент среди множества продуктов твердофазного синтеза.

Сочетание твердофазного синтеза и высокоэффективной жидкостной хроматографии в настоящее время — *главный способ получения небольших количеств 15–20-членных пептидов*, в частности пептидных детерминант, используемых для получения специфических антител к тому или иному белку.

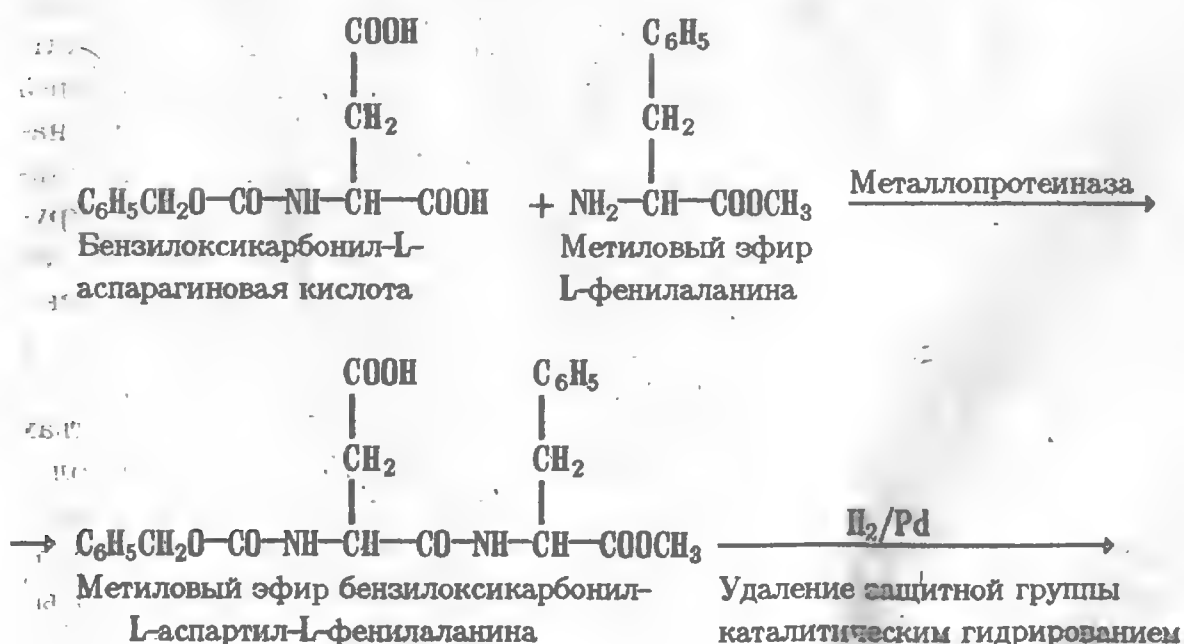
Применение различных приемов пептидного синтеза, по преимуществу твердофазного, позволило получить некоторые, как правило, не очень большие *белки*. Первоначально эти работы имели только принципиальный характер, демонстрируя возможность чисто химического синтеза белков. В последнее время, однако, проведены синтезы белков, имеющие практическое значение. В частности, в значительных количествах удается получать инсулин, ряд других пептидных гормонов, например кальцитонин рыб (32 аминокислотных остатка), синтезируемый партиями по 50 — 100 г, фактор роста эпителия (53 остатка), росттрансформирующий фактор α (50 остатков), интерлейкин-3 (140 остатков), α_1 - и α_2 -интерфероны лейкоцитов человека и их аналоги, панкреатический ингибитор трипсина. Синтезирована и использована для определения пространственной структуры протеиназа вируса иммунодефицита человека, пептидная цепь которой содержит 99 аминокислот. Характерно, что свертывание полученных синтетически пептидных цепей в нативную структуру происходит самопроизвольно и не вызывает существенных затруднений.

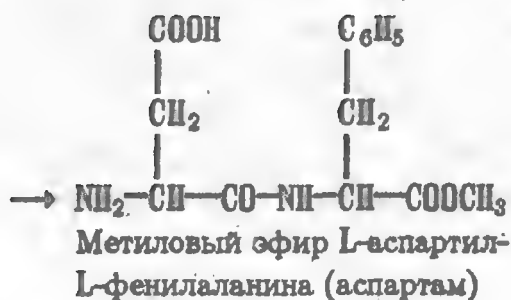
Несмотря на то что получение белков в значительных количествах в ближайшем будущем будет, по-видимому, основано на микробиологическом синтезе или синтезе в бесклеточной системе, возможны и дальнейшие успехи в развитии химических способов получения крупных пептидов и белков. Определенные перспективы имеет и так называемый *полусинтез* белков, при котором полипептидную цепь белка

собирают из пептидных фрагментов, полученных ограниченным протеолизом и чисто химическим путем с использованием химических, а иногда энзиматических методов их конденсаций. Такой подход был применен, в частности, для получения проинсулина человека присоединением ряда синтетических пептидных звеньев к выделенным из природного инсулина А- и В-цепям.

2.3. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ

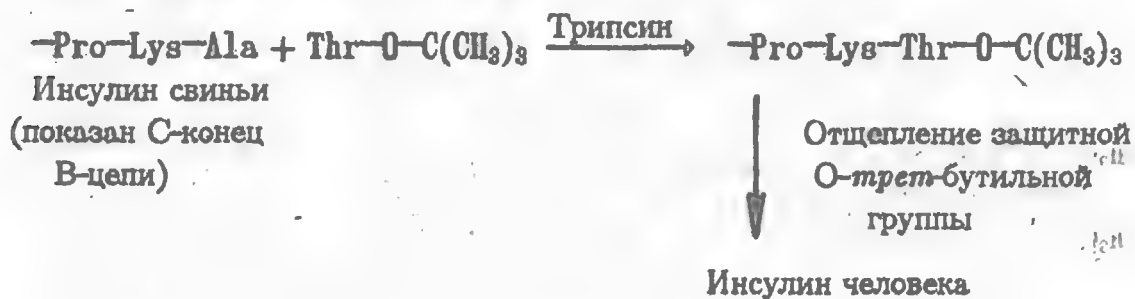
Протеолитические ферменты в обычных условиях катализируют гидролиз пептидных связей. Однако могут быть подобраны такие условия, при которых равновесие оказывается сдвинутым в сторону образования пептидной связи. Так, в концентрированных растворах бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты и метилового эфира L-фенилаланина металлопротеиназы, например термолизин, катализируют образование пептидной связи между ними, причем продукт реакции (метилловый эфир бензилоксикарбонил-L-аспартил-L-фенилаланина), будучи малорастворимым, выпадает в осадок в виде соли с еще одной молекулой метилового эфира L-фенилаланина. Именно эта низкая растворимость продукта, которая выводит его из сферы реакции, смещает равновесие в сторону синтеза. После снятия защитной группы каталитическим гидрированием получают метилловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина — *аспартам* — соединение, превосходящее сахарозу по сладости в 200 раз. Процесс используют для промышленного получения аспартама:





Еще один способ смещения равновесия в сторону синтеза — проведение катализируемой протеиназой реакции пептидного синтеза в органическом растворителе в присутствии малых количеств воды, достаточных только для гидратации фермента. Применяют при ферментативном синтезе и предварительную активацию одного из компонентов. Так, эфиры ацилированных пептидов в присутствии сериновых протеиназ быстро реагируют с аминокомпонентами — производными аминокислот или пептидов, образуя более длинные пептиды. Сдвиг равновесия в сторону синтеза в этом случае обеспечен активацией ацилирующего пептида за счет его превращения в сложный эфир; скорость катализируемого ферментом синтеза пептидной связи из эфира пептида гораздо выше скорости гидролиза этой же пептидной связи ферментом.

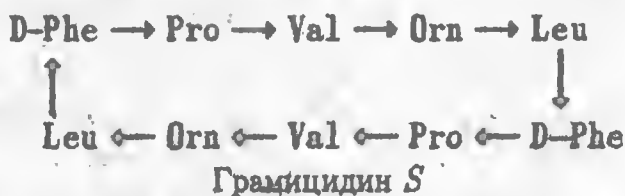
Описаны катализируемые ферментами частичные трансформации пептидов, например превращение свиного инсулина в инсулин человека, отличающийся от первого только заменой С-концевого остатка аланина в В-цепи на треонин. Это достигается путем катализируемого ферментом отщепления аланина и присоединения вместо него защищенного по карбоксильной группе остатка треонина, присутствующего в реакционной смеси в большом избытке:



2.4. ПРИРОДНЫЕ ПЕПТИДЫ

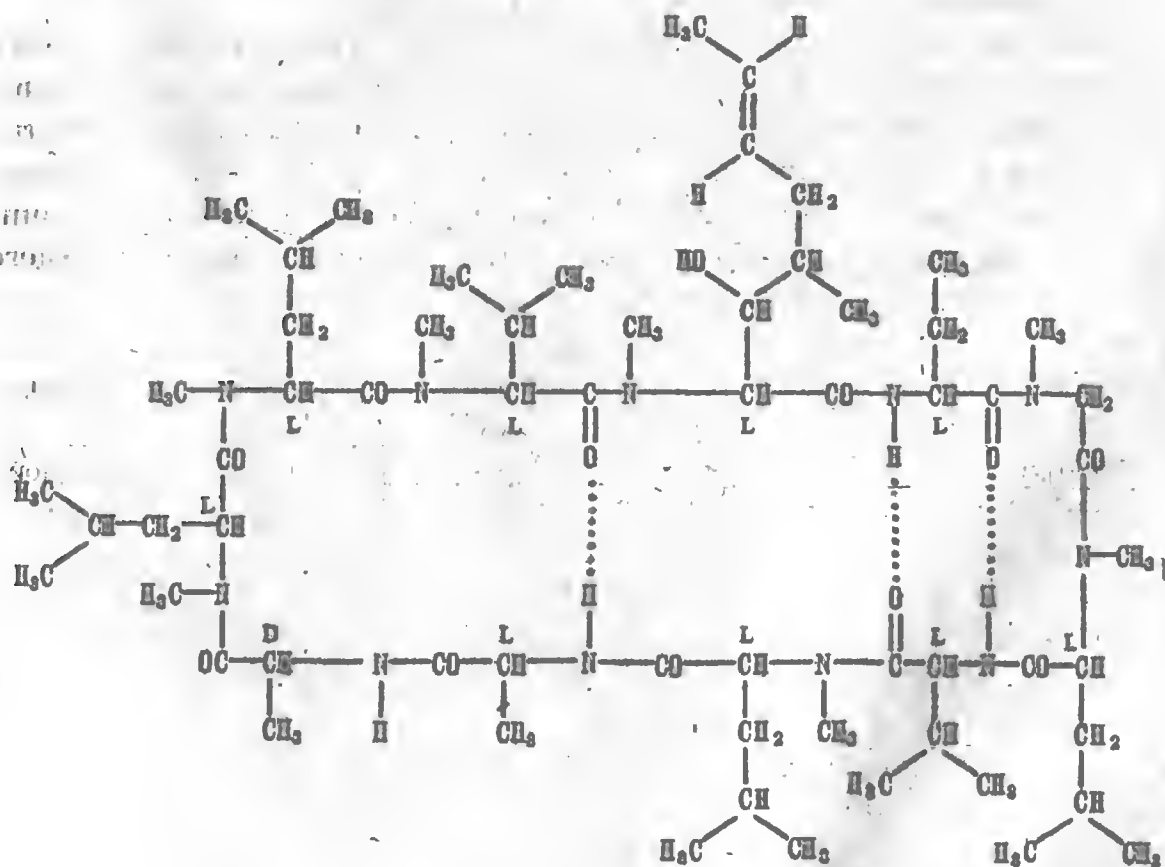
Пептиды в природных объектах не только появляются в качестве промежуточных продуктов деградации белка, они часто играют самостоятельную физиологическую роль.

Пептидные антибиотики в большинстве своем синтезируются микроорганизмами по особому нематричному механизму и содержат в своем составе ряд небелковых аминокислот, а также D-изомеров. Многие из них являются циклопептидами. Среди таких антибиотиков отметим циклодекапептид грамицидин S — антимикробный агент широкого спектра действия:



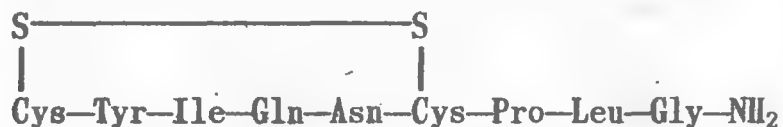
Следует обратить внимание на присутствие в молекуле небелковой аминокислоты — орнитина — и D-изомера фенилаланина. Стрелки показывают направление пептидных связей в цикле.

Эффективным иммунодепрессантом служит другой циклопептидный антибиотик — циклоспорин, содержащий N-метилированные и другие небелковые аминокислоты (непределенную оксиаминокислоту, α-аминомасляную кислоту, остаток D-аланина):



В последнее время обнаружены пептидные антибиотики, продуцируемые клетками животных, в особенности лимфоцитами. Они образуются по обычному пути биосинтеза белковых структур.

Пептидные гормоны, в более широком смысле — *регуляторные пептиды*, играют важнейшую роль в управлении метаболическими процессами в развитии организма, передаче сигналов. К их числу принадлежат некоторые короткие пептиды, например, *окситоцин*, стимулирующий сокращение матки и лактацию:



Окситоцин

Сходно построен нонапептид *вазопрессин*, подавляющий диурез и повышающий давление крови. *Адренокортикотропный гормон* (АКТГ), пептидная цепь которого состоит из 39 аминокислотных остатков, регулирует функцию надпочечников и может затрагивать целый ряд процессов, в том числе мотивацию, обучаемость, поведение.

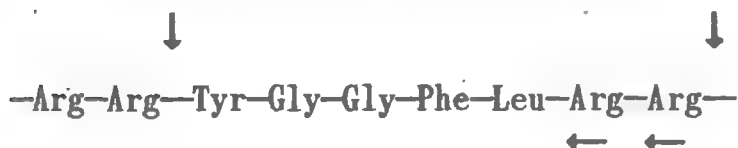
α -*Меланоцитостимулирующий гормон* $\text{CH}_3\text{CO-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH}_2$ контролирует образование меланина в пигментных клетках позвоночных, но влияет и на функционирование нервной системы, поведенческие реакции, а также развитие плода.

Следует отметить, что функции пептидных гормонов, как правило, многозначны, причем нередко в них удается выделить участки последовательности, ответственные за отдельные типы биологической активности. Для пептидных гормонов характерны процессы посттрансляционной модификации: в случае α -меланоцитостимулирующего гормона — ацетилирование $\alpha\text{-NH}_2$ -группы и амидирование α -карбоксила.

Биосинтез пептидных гормонов и других регуляторных пептидов протекает так же, как и синтез белков. Многие физиологически активные пептиды, в особенности короткие, синтезируются в виде *предшественников* — полипептидов гораздо большей длины. Последние затем подвергаются ограниченному протеолизу специфическими ферментами, которые, действуя на строго определенные связи, высвобождают активные пептиды. Так, *энкефалины* — пептиды, взаимодействующие с теми же рецепторами, что и морфин, и представляющие собой природные анальгетики, — синтезируются в виде предшественника, в пептидной цепи которого последовательности энкефалина Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu или Tyr-Gly-Gly-Phe-Met повторяются несколько раз. Им

предшествуют и за ними следуют пары Arg—Arg, которые служат сигналом для действия специфической протеиназы, расщепляющей пептидную связь после такой пары остатков аргинина:

Пептидные связи, атакуемые специфической
протеиназой в предшественнике энкефалина



Остатки, отщепляемые
карбоксипептидазой

Оба остатка аргинина затем отщепляются специфической карбоксипептидазой, высвобождающей энкефалин.

Нередко оказывается, что пептиды могут имитировать поведение соответствующих пептидных фрагментов белка в его взаимодействии с другими биологическими молекулами, в частности с иными белками, например с рецепторами или структурообразующими молекулами. Так, пентапептидный фрагмент белка соединительной ткани ламинина, имеющий последовательность Tyr—Ile—Gly—Ser—Arg, ответствен за присоединение к этому белку клеток. Пентапептид такой же структуры способен препятствовать этому, по-видимому, блокируя рецепторы на поверхности клеток, вовлеченные во взаимодействие с ламинином.

ГЛАВА 3 ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Выделение практически чистого индивидуального белка (в таких случаях нередко употребляют не вполне удачный термин "гомогенный белок") — необходимая предпосылка для изучения его строения и функциональных свойств. Технические приемы, используемые для этого, весьма многообразны и быстро совершенствуются, причем наряду с развитием микрометодов все чаще возникает необходимость масштабирования процессов, с тем чтобы получать крупные количества высокоочищенных белков для нужд медицины и биотехнологии. Особенно обострилась потребность в эффективных методах разделения белков с развитием генно-инженерных способов их получения. В данной главе рассмотрены лишь наиболее общие принципы препаративной химии белков.

3.1. ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

Получение чистых химических индивидуальных белков включает в себя как удаление небелковых примесей, так и разделение между собой собственно белковых компонентов. Последняя часть задачи в силу сходства физико-химических свойств белков особенно сложна, поэтому именно ее решение определяет выбор тех или иных схем выделения белка. При этом необходимо учитывать некоторые особенности поведения, присущие всем белкам.

К ним относится прежде всего способность белков подвергаться *денатурации*, т.е. претерпевать такие изменения пространственного строения, которые приводят к утрате или частичной потере функциональных свойств. Правда, денатурация во многих случаях обратима, однако эта обратимость не обеспечивается автоматически, а требует в каждом отдельном случае подбора специальных приемов. В то же время полностью или даже частично денатурированные белки весьма уязвимы для необратимых повреждений, в особенности для действия протеолитических ферментов, поэтому условий, способствующих денатурации, следует всемерно избегать.

Для предотвращения тепловой денатурации выделение белка проводят при *низкой температуре*, обычно при 4°C . Необходимо также *избегать крайних значений pH*. Белки легко денатурируют при низких pH из-за протонирования отрицательно заряженных в нормальных условиях карбоксильных групп и возникающего вследствие этого резкого преобладания положительных зарядов, которое благоприятствует разворачиванию компактной структуры. В щелочной среде при pH 10 и выше утрачиваются положительные заряды, обусловленные протонированием ϵ -аминогрупп лизина, и опять-таки наступает декомпенсация зарядов на поверхности, дестабилизирующая глобулу. Одновременно фенольные гидроксилы тех остатков тирозина, которые были скрыты внутри глобулы, получив отрицательный заряд, стремятся выйти на поверхность, что также способствует денатурации белка.

В еще более щелочных растворах происходят *реакции, необратимо повреждающие белок*, — отщепление серы от остатков цистеина и цистина, β -элиминирование фосфатных остатков в фосфопротеинах, отщепление полисахаридных цепей, присоединенных к остаткам серина в гликопротеинах. Образующиеся в результате этих реакций остатки неопределяемой аминокислоты — *дегидроаланина* — присоединяются к близлежащим ϵ -аминогруппам лизина с образованием так называемого *лизиноаланина* — соединения, присутствие которого в кислотном гидролизате белка свидетельствует о глубоком повреждении его структуры:



Причиной денатурации может стать применение *органических растворителей*, способных нарушить существенную для стабильности белка систему гидрофобных контактов внутри глобулы. Надо также учитывать возможность денатурации белка *на границе раздела фаз*, в особенности при образовании пены. При выделении очень малых количеств белка, не редком в современной биохимии, следует считаться с потерями, вызываемыми его *адсорбцией*, часто необратимой, на поверхности стекла или полимерных материалов, особенно значительной на заключительных стадиях очистки.

Особую опасность при выделении белков представляют содержащиеся в исходном материале *протеолитические ферменты*, даже если они присутствуют в следовых количествах. Повреждение, которое приводит к образованию ложных множественных форм белка, а иногда и его глубокое расщепление становятся особенно вероятными, если схема выделения включает условия, приближающие белок к денатурации. Для предотвращения протеолиза необходимо уже на ранних стадиях очистки включать операции, направленные на отделение протеиназ, прибавлять к смеси ингибиторы различных классов протеиназ. Очень важно проводить очистку белка быстро, что снижает опасность протеолиза и вероятность денатурации.

Распространено мнение об особой *нестабильности чистых белков*. Действительно, содержащиеся в неочищенных препаратах посторонние белки в определенной мере защищают белок от денатурирующих воздействий и протеолиза. На промежуточных стадиях, когда полная

очистка еще не достигнута, опасность протеолиза увеличивается, с удалением же следов протеиназ на завершающих этапах очистки стабильность белка должна вновь возрасти. Впрочем, возрастает и опасность сорбционных потерь на поверхностях, которые могут восприниматься экспериментатором как присущая чистому белку нестабильность.

3.2. ХАРАКТЕРНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ, НА КОТОРЫХ ОСНОВАНО ИХ РАЗДЕЛЕНИЕ

На каких физико-химических особенностях белков могут быть основаны способы их разделения? Во-первых, это *размер молекулы, ее геометрия*. На использовании этой особенности базируются методы гель-хроматографии и ультрафильтрации, отчасти электрофорез в гелях.

Во-вторых, характерное для данного белка *распределение заряженных групп на его поверхности*. Соотношение катионных и анионных групп в белке меняется в зависимости от pH, изоэлектрические точки белков — pI (значения pH, при котором положительные и отрицательные заряды белка полностью компенсированы и суммарный заряд равен нулю) существенно различаются у разных белков. Известны белки, являющиеся в физиологических условиях катионными, анионными или молекулами без заметного преобладания того или иного заряда. На различии заряда белков при разных pH основано их разделение методами электрофореза, изоэлектрического фокусирования, изоэлектрической и ионообменной хроматографии. Существенно, однако, не только соотношение заряженных групп, определяющее значение pI. Белки со сходными изоэлектрическими точками могут различаться распределением заряженных функциональных групп по поверхности глобулы. Последние размещаются более или менее равномерно либо, наоборот, образуют локальные сгущения, гроздя одинаково заряженных групп, что сказывается при ионообменной хроматографии белка.

В-третьих, белки различаются *числом и характером гидрофобных участков поверхности*, что используют при гидрофобной хроматографии.

Заметим, что ни один из рассмотренных выше признаков не может сам по себе обеспечить выделение индивидуального белка из сложной смеси — они недостаточно характеристичны, не гарантируют избирательности очистки. Значительно более перспективно в этом отношении *использование для выделения функциональных свойств белка*. Действи-

тельно, среди множества белков в исходном материале найдется немало таких, которые имеют сходную молекулярную массу или близкие изоэлектрические точки, однако число, например, фосфатаз или амилаз будет заведомо небольшим. Очевидно, что метод выделения, основанный на использовании способности этих ферментов взаимодействовать со своим специфическим субстратом, несравненно избирательнее, чем любой прием, базирующийся на разнице физико-химических свойств.

Схемы выделения белков, использующие только один какой-либо принцип, редки, обычно различные подходы к фракционированию сочетаются и дополняют друг друга.

3.3. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЕ. ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЯ (ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ)

В этом методе используют гранулированные гели поперечно-сшитых гидрофильных материалов, например декстрана (сефадекс, сефароза и их аналоги), полиакриламида (биогели и их аналоги), поливинилового спирта (тойоперл). Гранулы образованы трехмерной сеткой полимера, которая непроницаема для крупных молекул, частично проницаема для молекул промежуточного размера и хорошо проницаема для небольших молекул, солей и воды. В зависимости от среднего размера ячейки полимерного геля и геометрии молекулы последней доступна большая или меньшая часть общего объема гранул геля.

При движении раствора, содержащего белки и другие молекулы, по колонке, которая заполнена набухшими гранулами геля, компоненты смеси, проникшие в гель, задерживаются в нем. Таким образом они отстают от более крупных молекул, которые не могут войти внутрь гранул и находятся только в омывающем их растворе. Не будучи включенными в гель, крупные молекулы появляются в элюате, как только через колонку пройдет "свободный" объем раствора V_0 , равный объему раствора, заключенному между гранулами геля. Последний определяется плотностью упаковки и геометрией гранул. Для сферических частиц, в виде которых обычно и выпускаются материалы для гель-хроматографии, свободный объем составляет 30—35% общего объема колонки V_t .

Если размеры молекул белка таковы, что они могут проникать в поры, составляющие некоторую часть объема гранул, то будет наблюдаться задержка элюции и белок появится в объеме V_e , связанном с коэффициентом доступности $K_{\text{дост}}$ (долей объема гранул, доступной данному виду молекул) соотношением

$$K_{\text{дост}} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0},$$

где V_t — полный объем колонки, за вычетом той его части, которая приходится на сам гельобразующий полимер.

Каждому белку в зависимости от размеров его молекулы соответствует свое значение $K_{\text{дост}}$, на чем и основано разделение при гель-хроматографии. Понятно, что если объем элюции V_e близок к свободному объему V_0 , то $K_{\text{дост}}$ стремится к нулю и разделения белков, молекулы которых практически не входят в поры геля, не произойдет. Точно так же молекулы небольших размеров, для которых проникаем весь объем геля (V_e близок к V_t и $K_{\text{дост}}$ стремится к единице), в геле с данными характеристиками не разделятся. Наилучшее разрешение получается, если $K_{\text{дост}}$ находится в пределах 0,4 — 0,6. Разумеется, пределы разделения можно расширить, используя для высокомолекулярных белков крупнопористые, а для небольших — мелкопористые гели.

Строго говоря, при гель-хроматографии разделение белков определяется не молекулярной массой, а *геометрическими размерами молекулы*. Соответственно, молекулы вытянутой формы за счет "кувыркания" в растворе труднее проникают в гели, чем сферические молекулы такой же молекулярной массы. Этим объясняется равная элюция денатурированных белков, которые ведут себя как неупорядоченный рыхлый клубок, а не как компактная глобула.

Простая зависимость между объемом элюции и молекулярной массой белка (справедливая, конечно, только для компактных сферических молекул) и легкость эксперимента сделали гель-хроматографию излюбленным методом определения молекулярной массы белков. Для этой цели колонку, заполненную соответствующим гелем, калибруют набором белков с известными молекулярными массами, после чего определяют объем элюции изучаемого белка и вычисляют его молекулярную массу интерполяцией (рис. 3.1). Точность метода не очень велика, но вполне достаточна для большинства практически встречающихся задач.

При использовании данного метода необходимо учитывать ограничения, возникающие из-за того, что гельобразующий материал не вполне инертен, как это предполагает теория метода, и может взаимодействовать с разделяемыми веществами, что искажает зависимость объема элюции от размера молекулы. Это особенно сказывается при разделении малых количеств белка, так как сорбционная емкость матрицы геля невелика и в крупномасштабных опытах ее взаимодействие с белком мало отражается на процессе.

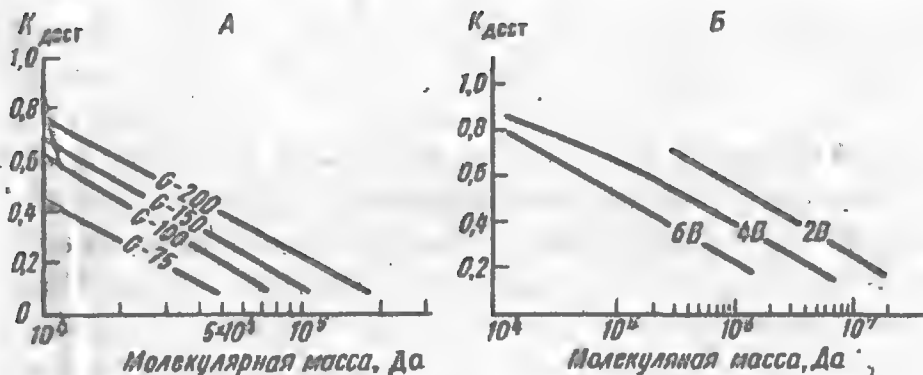


Рис. 3.1. Графики зависимости между молекулярной массой белков и коэффициентом доступности для сефадексов серии G "сверхтонких" (А) и сефарозы 2В, 4В и 6В (Б)

Наилучшие результаты достигаются, если $K_{\text{дост}}$ для выделяемого белка лежит в диапазоне 0,4 – 0,6

Связывание белков гельобразующими материалами может быть вызвано ионообменными взаимодействиями, в частности содержанием отрицательно заряженных групп в полисахаридных матрицах (сефароза, сефадекс), а также в полиакриламидных материалах. В последних карбоксильные группы возникают при спонтанном гидролизе амидов, в полисахаридах же они могут образовываться в результате окисления. Задержка при гель-хроматографии, вызванная ионообменными взаимодействиями с матрицей, особенно характерна для катионных белков, например лизоцима и некоторых субтилизинов. Нередко она весьма значительна и может даже препятствовать отделению солей от белка. В аналитических опытах такое удерживание удается подавить значительным повышением ионной силы раствора.

Еще одна причина аномального удерживания веществ при гель-хроматографии, особенно заметная при выделении небольших молекул, например пептидов, — гидрофобное связывание с матрицей геля. Гидрофобные элементы включаются в гидрофильные полисахаридные матрицы при обработке их сшивающими агентами, в частности эпихлоргидрином, при синтезе сефадекса. Пептиды, содержащие гидрофобные, в особенности ароматические, остатки (фенилаланина, триптофана) иногда удерживаются матрицей столь значительно, что появляются в элюате позже неорганических солей.

Разрешающая способность метода не очень велика, в то же время простота проведения и мягкость условий эксперимента являются его бесспорными преимуществами. Применимость метода на первых этапах очистки ограничивается тем, что для удовлетворительного фракционирования белков объем наносимого раствора не должен превышать

3—5% общего объема колонки. Ввиду этого к гель-хроматографии обычно прибегают в середине или на завершающих этапах выделения белка. Разумеется, при отделении низкомолекулярных примесей, в частности при обессоливании, объем образца может быть значительно большим, поскольку не требуется высокого разрешения. В таком упрощенном варианте гель-фильтрацию используют особенно часто.

Несмотря на указанные ограничения, гель-хроматография — удобный способ фракционирования белков. Его применяют и для отделения от белков низкомолекулярных примесей, в том числе солей.

В последнее время наряду с гелеобразующими материалами для разделения белков по размерам начали применять *макропористые неорганические носители* — макропористые стекло и силикагель. Обычно поверхность этих материалов покрывают гидрофильными органическими веществами, чтобы исключить необратимую сорбцию белков. Жесткость этих материалов позволяет разделять белки по размеру молекул при повышенных давлениях, что ускоряет процесс и снижает помехи со стороны диффузии.

3.4. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ

Метод ионообменной хроматографии, основанный на различиях в соотношении и распределении заряженных групп на поверхности белка, принадлежит к числу наиболее используемых. В хроматографии белков практически не применяют синтетические ионообменные смолы на основе полистирола, весьма популярные в аналитической химии, аминокислот и пептидов. Это объясняется, во-первых, большим содержанием поперечных сшивок, делающих материалы такого рода практически непроницаемыми для белков, во-вторых, сорбцией белков, подчас необратимой, на гидрофобной поверхности полистирола.

По указанным соображениям для разделения белков используют ионообменники, в которых *матрица* ("подложка") *отчетливо гидрофильна*. Особенно распространены ионообменники, получаемые присоединением ионогенных групп к целлюлозе, поперечно-сшитым декстранам (сефадексы).

Для получения катионитов в качестве ионогенной чаще всего используют *карбоксильную группу*, pK_a которой, несколько изменяющийся в зависимости от микроокружения, близок к 4 (карбоксиметил (СМ)-производные целлюлозы, сефадекса, содержащие группировки



Карбоксильные группы таких ионитов отрицательно заряжены при pH 5 и выше и, следовательно, способны связывать белки, которые в этих условиях несут положительный заряд. Связывание белков усиливается, если на их поверхности встречаются скопления ("гроздь") катионных групп. При прочих равных условиях с катионитом *лучше связываются белки большей молекулярной массы*, что объясняется кооперативностью многоточечного взаимодействия обширных участков поверхности такого белка с анионными группами ионообменника.

Десорбция белков, связанных катионитом, обычно достигается повышением ионной силы элюирующего раствора, причем взаимодействующие между собой заряженные группы белка и ионита оказываются в окружении противоположно заряженных ионов солей. В результате при определенной концентрации соли, характерной для каждого белка, электростатические взаимодействия между ним и ионитом снимаются и белок элюируется с колонки. Плавное увеличение ионной силы раствора, применение линейного или более сложного градиента концентрации соли вызывает десорбцию сначала наиболее слабо удерживаемых молекул, затем более прочно связанных белков и т.д. В препаративных опытах нередко прибегают к ступенчатой элюции, при которой концентрация соли повышается скачками. Это ускоряет разделение и позволяет собрать белок в небольшом объеме, однако легко приводит к образованию одним и тем же белком нескольких ложных пиков.

При промывании колонки с ионитом раствором соли подходящей концентрации белок десорбируется, иногда образуя довольно длинный "хвост", что может быть следствием неравномерного распределения ионных групп в сорбенте. Участки с их повышенным содержанием, скопления таких групп прочнее удерживают белок, что и вызывает задержку элюции и образование "хвоста". В такой ситуации скачкообразное повышение ионной силы элюирующего раствора резко улучшает условия десорбции, поэтому часть белка, которая в обычных условиях образовывала бы "хвост", десорбируется скачком, давая ложный пик.

Ввиду этого следует *определять белковый состав каждой фракции независимым методом*, например электрофорезом в полиакриламидном геле, или подвергать сомнительные пики повторной хроматографии в тех же условиях. Несоблюдение таких предосторожностей нередко приводит к ошибочному обнаружению "множественных форм" белков.

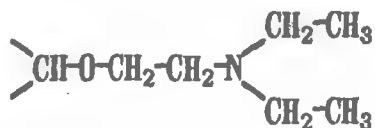
В принципе для десорбции белков с катионитов можно прибегать и к градиенту pH. Например, понижение pH до 3—4 приводит к протонированию карбоксилатных ионов карбоксиметилцеллюлозы или анало-

гичных ионитов и постепенной десорбции связанных с ними белков. Можно рассчитывать и на достижение изoeлектрической точки сорбированного белка, что опять-таки вызвало бы его десорбцию. Однако такой прием используют не часто не только из-за опасности денатурации белков при понижении pH, но и из-за осложнений, связанных с сорбцией ионитом части ионов элюирующего раствора и неопределенностью вызываемых этим локальных изменений pH. По таким же соображениям не рекомендуется использовать в ионообменной хроматографии белков растворы, содержащие несколько разных катионов или анионов.

Помимо карбоксильных катионитов, о которых шла речь выше, применяют катиониты, содержащие сульфогруппы $-SO_3^-$, например сульфопропилсефадекс. В отличие от карбоксильных сульфогруппы сохраняют отрицательный заряд практически при всех pH, используемых в хроматографии белков.

Ионогенные группы фосфоцеллюлозы слабее, чем у сульфопропилсефадекса, но сильнее карбоксильных. Оказалось, что этот ионообменник может применяться в качестве биоспецифического сорбента при выделении некоторых ферментов фосфорного обмена.

Среди анионитов наибольшее распространение получили диэтиламиноэтил (DEAE)-целлюлоза и ее аналоги с иными матрицами:



Диэтиламиноэтильная группа, присоединенная к целлюлозе или другой полисахаридной матрице

Основность диэтиламиноэтильной группы в сорбентах этого типа несколько ниже обычной из-за влияния окружающих ее гидроксильных групп, так что ее pK_a равен 9,5. DEAE-целлюлоза эффективна как анионообменник вплоть до pH 8,5 — 9,0. Аниониты, содержащие четвертичные аммонийные группы, — QAE-сефадекс или QAE-сефароза сохраняют положительный заряд и при более высоких pH.

Хроматография белков на DEAE-целлюлозе и аналогичных анионитах, подобно хроматографии на катионитах, определяется многоточечным связыванием отрицательно заряженных групп белка (прежде всего карбоксильных) с катионными группами ионообменника. Как и при хроматографии на катионитах, десорбции белков достигают повышением ионной силы элюирующего раствора, ее можно проводить ступенчато или с применением градиента концентрации соли. И в этом слу-

чае не рекомендуют градиенты pH и использование растворов, содержащих разные анионы. Например, при десорбции белков хлористым натрием с DEAE-целлюлозы, уравновешенной ацетатным буфером, помимо экранирования разноименно заряженных групп сорбента и белка происходит замещение удерживаемых анионитом ацетат-ионов ионами хлора. Если элюция проводится в слабокислых растворах, десорбируемые ацетат-ионы, связывая протоны, вызовут сдвиг pH в щелочную сторону, что приведет к локальному изменению условий элюции и сделает процесс трудно контролируемым.

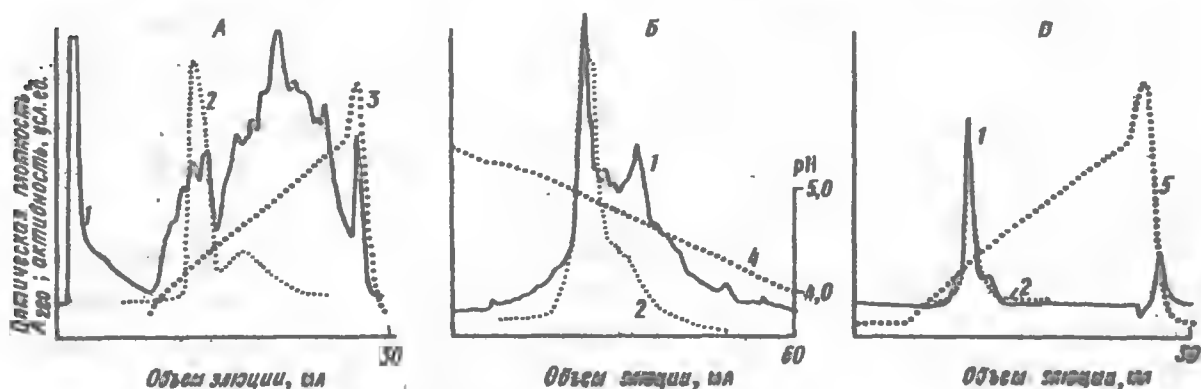


Рис. 3.2. Очистка щелочной фосфатазы ионообменной хроматографией:

1 – оптическая плотность при 280 нм, отражающая общее содержание белка; 2 – активность щелочной фосфатазы;

А – разделение неочищенного препарата на анионите Моно-Q при pH 8 в градиенте концентрации NaCl 0 – 0,35 М (3);

Б – хроматофocusing на Моно-Р щелочной фосфатазы, очищенной на предыдущей стадии в градиенте pH (4);

В – хроматография фракции, выделенной на Моно-Р, на анионите Моно-Q в градиенте концентрации NaCl (5)

В последнее время в хроматографии белков все шире применяют ионообменники на основе гидрофильных органических полимеров, получаемых в форме шариков строго одинакового диаметра (10 мкм) и обладающих большой рабочей поверхностью. Стандартность гранул таких ионитов снижает размывание хроматографических пиков за счет различий во времени диффузии белковых молекул внутри сорбента – фактор, ограничивающий эффективность обычных ионообменников с неодинаковыми гранулами. Носители этого типа жестки, что позволяет достигать весьма высоких скоростей протекания растворов через колонку при давлении порядка 20 атм¹. Совместное действие этих факторов резко повышает эффективность и скорость хроматографии бел-

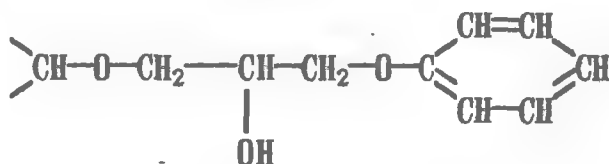
¹ 1 атм = 0,1 МПа.

ков на такого рода сорбентах, получившей название *быстрой жидкостной хроматографии белков* (английское сокращенное обозначение FPLC). В качестве сорбентов используют Моно-Q — сильный анионит с четвертичными аммонийными группами, Моно-S — сильный катионит, содержащий сульфогруппы, или Моно-P — катионит с фосфатными группами (рис. 3.2).

К сожалению, до сих пор не удалось разработать достаточно эффективный способ препаративного электрофореза белков в гелях, хотя их аналитическое разделение электрофорезом в полиакриламидном геле дает очень хорошие результаты и является ведущим методом в исследовании белковых смесей и индивидуальных белков.

3.5. ГИДРОФОБНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ

Как известно, поверхность белковой глобулы богата гидрофильными аминокислотами, но в то же время содержит немало (до половины от их общего содержания) гидрофобных остатков, нередко образующих скопления ("гроздь"). Такие гидрофобные зоны, развитые в большей или меньшей степени, представляют характерную особенность структуры каждого белка, на чем и основан метод гидрофобной хроматографии. Соответствующие сорбенты синтезируют, включая гидрофобные группировки в гидрофильную матрицу, например в поперечно-сшитую агарозу — сефарозу. По такому принципу построены, в частности, октил- и фенилсефароза:



Фенилсефароза

При пропускании белкового раствора через фенилсефарозу гидрофобные участки поверхности белков образуют контакты с фенильными группами, вытесняя прилегающие к этим структурам молекулы воды. Число и прочность таких контактов весьма различны у разных белков. Повышению их прочности способствует сорбция белков из концентрированных растворов солей, например сульфата аммония. Плавное понижение концентрации соли в растворе, протекающем через колонку с фенилсефарозой, приводит к поочередной десорбции белков (рис. 3.3).

Сходным образом действуют сорбенты, полученные присоединением к макропористому кремнезему гидрофобных алкильных радикалов

различной длины. Они, будучи жесткими, особенно подходят для работы при повышенном давлении в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, англ. HPLC). Те из них, которые содержат длинные — C_{18} — углеводородные цепи, малоприспособлены для разделения белков из-за слишком сильного, нередко необратимого связывания, но могут применяться для хроматографии пептидов. Лучшие результаты дает хроматография белков на сорбентах, содержащих более короткие — C_4 — C_8 — углеводородные цепи.

Нередко гидрофобная хроматография сочетается с другими эффектами. Например, присоединение к активированной бромцианом сефарозе диаминов различной длины дает сорбенты, в которых содержатся гидрофобные углеводородные цепочки наряду с двумя катионными группами. Объединение черт гидрофобного сорбента и анионита в одном хроматографическом материале обогащает его возможности.

Описанный выше способ проведения хроматографии на гидрофобном сорбенте — далеко не единственно возможный. Для сорбции белков не обязательно введение в раствор повышенных концентраций соли, а для элюции можно применять добавление органических растворителей, сдвиг pH. В некоторых случаях, когда связывание белка основано на сочетании гидрофобных и ионных взаимодействий, хорошие результаты дает элюция растворами солей. Отметим также, что признаки гидрофобной хроматографии встречаются и в других приемах разделения белков, в особенности в аффинной хроматографии.

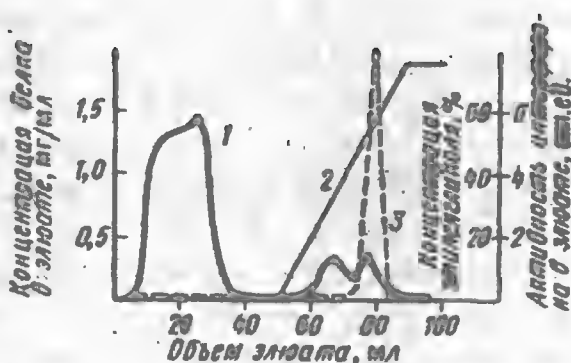


Рис. 3.3. Выделение интерферона фибробластов человека гидрофобной хроматографией на фенилсефарозе CL-4B:

1 — содержание белка в элюате, 2 — градиент концентрации этиленгликоля, использованного для десорбции, 3 — активность интерферона; хорошо видны "проскок", содержащий белки, которые не связываются с сорбентом, и пик очищенного интерферона

3.6. АФФИННАЯ, ИЛИ БИОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ, ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ

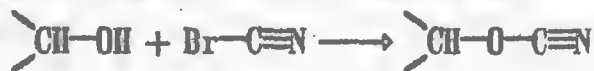
Как уже отмечалось, способы разделения белков, основанные на различиях в их физико-химических свойствах, не могут быть высокоспецифичными. С этой точки зрения гораздо перспективнее препаративные методы, которые базируются на функциональных различиях

белков. Для множества белков, включая ферменты, их ингибиторы, транспортные белки, иммуноглобулины, регуляторные белки, токсины, рецепторы, — главнейшая функциональная черта состоит в способности избирательно связывать те или иные лиганды — субстраты, коферменты, аллостерические эффекторы, антигены и т.п.

Такое связывание по существу своему весьма специфично, и это свойство резко выделяет тот или иной белок из множества других. На использовании функционально обусловленной способности белков обратимо связываться с соответствующими лигандами и основан метод аффинной, или биоспецифической, хроматографии.

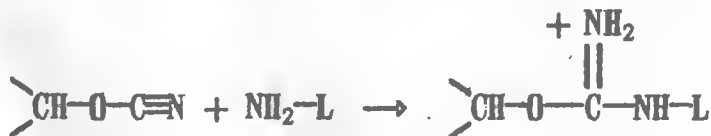
Для синтеза аффинного сорбента отвечающий специфичности данного белка лиганд (субстрат или его аналог при хроматографии фермента) присоединяют к инертной матрице так, чтобы возможно меньше затронуть те элементы его структуры, которые непосредственно участвуют во взаимодействии с белком. Иногда лиганд прямо вводят в реакцию с функциональными группами на поверхности матрицы, однако чаще их соединяют через промежуточное звено ("вставку", "ножку" и т.п.), чтобы отдалить лиганд от матрицы и уменьшить пространственные препятствия для его сближения с белком.

К каждому из элементов структуры аффинного сорбента предъявляются определенные требования. Матрица должна быть инертной и не создавать стерических препятствий для белка. Чаще всего в качестве матрицы используют макропористые гели, образованные поперечно-сшитыми гидрофильными полимерами, например производное агарозы — сефарозу, синтетические полимеры или неорганические носители макропористые производные кремнезема — силикагель или стекло. Присоединение лигандов к сефарозе (непосредственно или через вставку) обычно проводят, активируя ее бромцианом. Бромциан (сильный яд!) в щелочной среде реагирует с гидроксильными группами сефарозы, образуя весьма активный эфир изоциановой кислоты:



Эфир изоциановой кислоты

Последний взаимодействует затем с аминогруппами лиганда L или "вставки" с образованием производного изомочевины, которое является сильным основанием и в обычном диапазоне pH несет положительный заряд:



Лиганд

Производное изомочевины

Таким образом, присоединение лиганда к сепарозе, активированной бромцианом, одновременно создает на матрице эквивалентное содержанию лиганда число катионных групп. Следовательно, такой сорбент помимо биоспецифического связывания белка лигандом может проявлять свойства анионита, что необходимо учитывать при его использовании.

Известны и другие способы присоединения лигандов к матрице, однако в каждом случае следует учитывать изменения в характере носителя, сопровождающие реакцию с лигандом, а также большую или меньшую неустойчивость образовавшейся связи, которая иногда может вызывать постепенную "утечку" лиганда. Например, изомочевина может превращаться в производное гуанидина в присутствии значительных концентраций первичных аминов или аммиака, что влечет за собой отщепление лиганда.

Сложнее требования, предъявляемые к лиганду. Он прежде всего должен достаточно сильно взаимодействовать с белком. Так, принято считать, что для получения сорбентов, предназначенных для выделения ферментов, в качестве лигандов могут быть использованы такие ингибиторы или аналоги субстрата, которые имеют константу ингибирования (субстратную константу), т.е. константу диссоциации фермент — лиганд, не хуже 10^{-4} М. При этом учитывается, что присоединение лиганда к матрице ухудшает (т.е. повышает) константу ингибирования по крайней мере на один порядок.

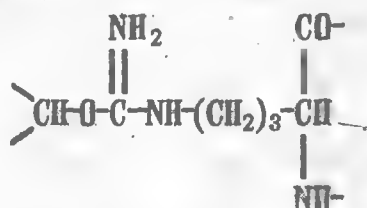
При подборе лигандов для аффинной хроматографии ферментов приходится изменять структуру субстрата, чтобы предотвратить возможность его превращения ферментом в продукт, например, расщепления пептидного лиганда, если речь идет о хроматографии протеиназ. Очевидно, что сорбент, содержащий в качестве лиганда истинный субстрат, будет трансформирован при первом же контакте с ферментом и окажется непригодным.

При пропускании раствора, содержащего сложную смесь белков, других биополимеров, низкомолекулярных соединений, солей, пигментов и т.п., через биоспецифический сорбент, построенный по описанной выше схеме, лиганд образует комплекс только с тем белком, который имеет участок связывания, комплементарный структуре лиганда. В результате именно этот белок удерживается аффинной колонкой, тогда как все остальные компоненты смеси проходят через нее не задерживаясь.

После промывания колонки для удаления неспецифически удерживаемых примесей белок элюируют, изменяя состав протекающего через колонку раствора так, чтобы ослабить взаимодействие белка с лигандом.

дом. Для этого прибегают к изменению рН, добавляют к элюенту неорганические соли, органические растворители. Все эти факторы, воздействуя на структуру зоны связывания лиганда и подавляя отдельные виды белок-лигандных взаимодействий, например ионные связи и гидрофобные контакты, обеспечивают десорбцию. В отдельных случаях прибегают к аффинной элюции раствором лиганда или его аналога. Этот прием, основанный на конкуренции за связывание белка между присоединенным к матрице и растворенным лигандами, весьма специфичен и эффективен, но дорог.

В качестве примера рассмотрим применение циклопептидного антибиотика — *грамицидина S* (см. гл. 2) — в качестве лиганда при аффинной хроматографии протеолитических ферментов. Он содержит ряд гидрофобных аминокислот, соответствующих специфичности многих протеиназ, и два остатка орнитина, δ-аминогруппы которых позволяют легко присоединить циклопептид к активированной бромцианом сефарозе или другим матрицам:

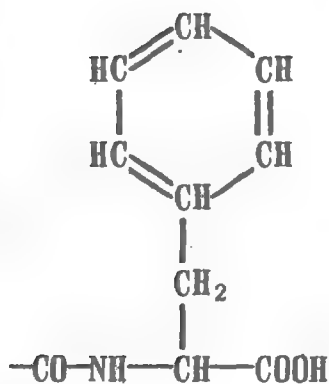


Остаток орнитина, аминогруппа которого присоединена к активированной бромцианом сефарозе

Грамицидин S связывает протеиназы различных классов, однако он устойчив к их действию и не подвергается гидролизу, по-видимому, из-за присутствия в структуре остатков D-фенилаланина, пролина, а также из-за особенностей конформации циклопептида. Следовательно, грамицидин S является природным аналогом субстратов протеиназ и хорошо подходит для роли лиганда широкой специфичности. Так, при пропускании через колонку с грамицидин-S-сефарозой сложной смеси веществ, содержащихся в культуральной жидкости одного из штаммов бактерии *Bacillus subtilis*, сорбент связывает только металлопротеиназу, которую удается полностью освободить от примесей и получить практически чистый белок.

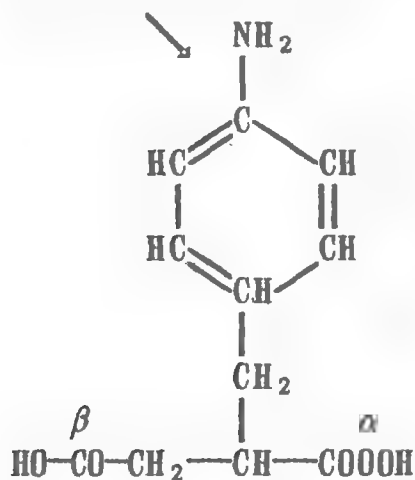
Еще эффективнее сорбенты, содержащие такие лиганды, которые взаимодействуют не только с зоной связывания, но и с каталитическим центром фермента. Например, производные бензиламинной кислоты оказались хорошими лигандами для выделения карбоксипептидаз — ферментов, отщепляющих аминокислоты от карбоксильного конца пептидной цепи. Сходство лиганда с субстратами карбоксипептидаз на первый взгляд невелико, однако оказывается, что группа

$\text{HOOC}-\text{CH}_2$ способна выступать в качестве своеобразного аналога пептидной связи:



С-Концевой остаток фенилаланина в пептидном субстрате карбоксипептидазы

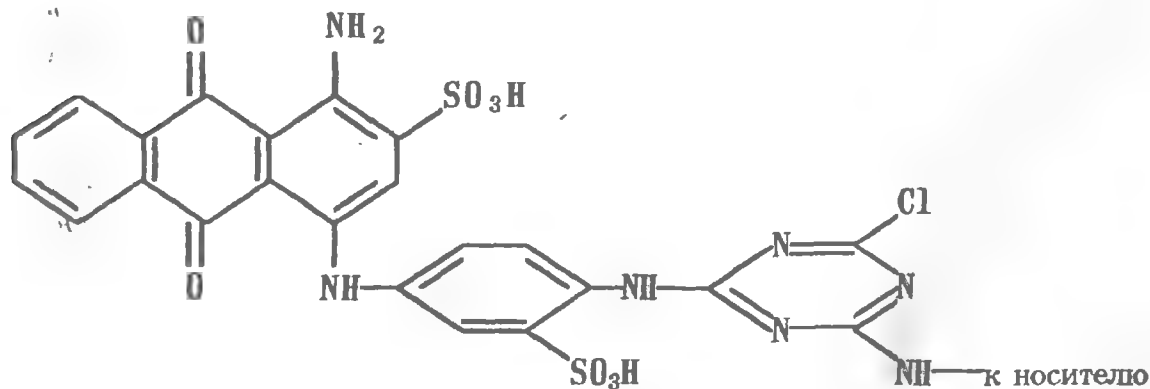
Аминогруппа, используемая для присоединения лиганда к матрице



Бензилянтарная кислота, имитирующая структуру остатка фенилаланина; группу $\text{CO}-\text{NH}$ заменяет $\text{CO}-\text{CH}_2$

В результате β -карбоксильная группа бензилянтарной кислоты взаимодействует с каталитическим центром фермента, а боковая бензильная группа и α -карбоксил — с компонентами зоны связывания субстрата. Образующийся комплекс лиганда, обычно присоединяемого к матрице через аминогруппу, введенную в *пара*-положение бензольного кольца, связывает фермент весьма прочно.

Широко используют своеобразный вариант аффинной хроматографии, основанный на применении в качестве лигандов синтетических красителей антрахинонового ряда, например цибакрона голубого;



Антрахиноновый краситель

Плоская структура, образованная тремя конденсированными ароматическими кольцами замещенного антрахинона, к которому в положении 1 присоединены замещенный анилин и триазиновый цикл, способна избирательно взаимодействовать с целым рядом белков. Лиганд связывается, по-видимому, во впадинах, которые нередки на поверхности белков, в особенности в активных центрах ферментов. Высказывались предположения, что антрахиноны вместе с присоединенными ядрами анилина и триазина образуют структуру, стерически близкую природным лигандам, например таким коферментам, как NAD, и имитируют свойственный последним способ связывания с белками. Ввиду этого сорбенты, содержащие цибакрон голубой и некоторые другие антрахиноновые красители, особенно рекомендуются для аффинной хроматографии белков, содержащих NAD или иные соединения нуклеотидной природы.

Нет необходимости, чтобы нуклеотид или сходное по строению соединение было похоже на субстрат — оно может имитировать эффектор, регулирующий активность фермента. Так, например, хорошие результаты дает хроматография на антрахиноновых красителях аспараткарбамилазы, где нуклеотиды выступают как аллостерические эффекторы.

Впрочем, круг белков, связываемых этими сорбентами, значительно шире и включает, например, сывороточный альбумин. Последний легко присоединяет различные лиганды, в том числе некоторые лекарственные препараты и триптофан, который можно (с большими оговорками) считать напоминающим конденсированные кольца антрахинона. Структура лиганда — замещенного антрахинона — не безразлична, поэтому, используя разные красители, удастся получить серию сорбентов, не одинаково связывающих различные белки.

3.7. ИММУНОСОРБЦИЯ

К числу наиболее специфических принадлежит взаимодействие белков с антителами — *иммуноглобулинами*. Это свойство с успехом используют для создания биоспецифических сорбентов, в которых роль лиганда выполняют специфические в отношении выделяемого белка иммуноглобулины. Получение и применение такого рода сорбентов происходят примерно так же, как и в обычной аффинной хроматографии, отличаясь лишь немногими особенностями. Во-первых, присоединение иммуноглобулина к матрице необходимо проводить в щадящих условиях. Установление между молекулой антитела и носителем множества ковалентных связей (которое может произойти, если добиваться повышения емкости сорбента) благоприятствует денатура-

ций белка и может, следовательно, привести к утрате специфичности антитела.

Во-вторых, использование обычных, поликлональных, антител, которые представляют собой весьма сложную смесь молекул иммуноглобулинов различного строения, приводит к получению сорбента, в котором содержатся антитела с широким диапазоном сродства к выделяемому белку-антигену. Это затрудняет его сорбцию и в особенности десорбцию, так как диссоциация целого набора неодинаковых комплексов антиген-антитело может потребовать вариации условий элюции в весьма широком интервале, вплоть до весьма жестких. Это осложнение снимается, если доступны моноклональные антитела, представляющие собой однородные молекулы иммуноглобулина. Десорбция и в этом случае может доставлять некоторые трудности из-за прочности комплекса, однако их удается преодолеть, подавляя нековалентные взаимодействия между выделяемым белком и иммуноглобулином при помощи изменения pH, ионной силы, добавления в элюент органических растворителей или мочевины.

Иммунсорбция особенно уместна как высокоспецифичный метод выделения небольших количеств особо ценных белков из сложных смесей, поскольку используемые сорбенты дороги и недолговечны из-за склонности иммуноглобулинов к денатурации. Очень важно, что к иммунсорбции можно прибегнуть даже в таких случаях, когда сведения о свойствах белка, в том числе и о его функции, скудны. Если известна первичная структура, определенная по нуклеотидной последовательности гена, то возможно синтезировать ряд фрагментов его пептидной цепи и, присоединив их к белку-носителю, иммунизировать таким конъюгатом животное. Это дает возможность получить антитела к исследуемому белку, несмотря на то что он не только не выделен, но и его функция пока неизвестна. Иммунсорбенты, синтезируемые присоединением таких антител к подходящему носителю, позволяют выделить белок.

Над.

и

3.8. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БЕЛКОВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

и

и

Методы генной инженерии позволяют присоединять к структурному гену белка последовательности, кодирующие такие белки или их фрагменты (домены), которые облегчают выделение конструкции в целом. Полученный гибридный ("химерный") белок во многих случаях, хотя и не всегда, жизнеспособен, причем обе части "химеры" независимо друг от друга свортываются в компактные структуры. Это

дает возможность, используя характерные свойства присоединенной к целевому белку структуры, провести специфическое выделение гибрида, после чего расщепить "шарнир", соединяющий обе его части.

Так, белки-гибриды, в которых одной из составных частей является белок А стафилококков, могут быть очищены хроматографией на колонках, содержащих присоединенные ковалентно иммуноглобулины. Белок А прочно связывается с последними. Гибридные белки, в состав которых входит β -галактозидаза или ее крупные фрагменты, могут быть очищены на колонках, специфически сорбирующих этот фермент, например содержащих ковалентно связанный аналог субстрата — аминифенилтиогалактозид. По завершении очистки гибридный белок подвергают ограниченному протеолизу или расщепляют связь между объединенными в его структуре белками специфическими химическими методами, например действием бромциана, и отделяют "целевой" белок от белка-носителя, что, как правило, не составляет затруднений.

Иногда к структурному гену белка присоединяют олигонуклеотидные фрагменты, которые кодируют короткие аминокислотные последовательности, наращивающие этот белок с аминного или карбоксильного конца. Эти последовательности выбирают так, чтобы они не препятствовали свертыванию белка и в то же время сообщали всей конструкции то или иное характерное свойство, которое позволяет легко выделить такую молекулу даже из очень сложной смеси. Затем эти фрагменты отщепляют в мягких условиях.

Так, присоединение к карбоксильному концу *дегидрофолатредуктазы* Lys—Gly—Ser—Arg—Ser двух остатков *гистидина* дает последовательность Lys—Gly—Ser—Arg—Ser—His—His. Соседствующие остатки гистидина образуют комплекс с ионом Ni^{2+} , который удерживается специально полученным сорбентом с хелатирующими группами. Это позволяет в одну стадию выделить клонированный *E.coli* фермент из культуральной жидкости практически чистым, с 90%-ным выходом. Отщепление обоих остатков гистидина карбоксипептидазой А приводит к дегидрофолатредуктазе с С-концевой последовательностью Lys—Gly—Ser—Arg.

Предложено к аминному концу рекомбинантных белков-лимфокинов присоединять последовательность Asp—Tyr—Lys—Asp—Asp—Asp—Asp—Lys, которую связывает специально полученное антитело. После очистки белка (модифицированного присоединением такой последовательности) иммуносорбцией его обрабатывают *энтеропептидазой* — ферментом, специфически отщепляющим этот пептид (см. гл. 11). По-видимому, описанный подход особенно перспективен для выделения и очистки рекомбинантных белков.

ГЛАВА 4 ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА

4.1. ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА КАК УРОВЕНЬ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА

К белкам относят полипептиды, способные самопроизвольно формировать и удерживать определенную пространственную структуру. Нельзя указать такого порога, границы, которые резко отделяли бы белки от пептидов. Действительно, известная способность к образованию предпочтительных конформаций в растворах замечается уже у сравнительно коротких пептидов, более того, эта способность существенна для функции некоторых пептидов (например, гормонов), облегчая их взаимодействие с клеточными рецепторами. И все же это только прообраз четкого соотношения между последовательностью аминокислот и пространственной структурой, которое составляет важнейшую отличительную особенность белка.

Стабилизация пространственной структуры требует хорошо развитой системы нековалентных взаимодействий, что может быть достигнуто лишь начиная с некоторой длины полипептидной цепи. Известны белки, полипептидная цепь которых содержит всего лишь около пятидесяти аминокислотных остатков. К ним относятся, например, панкреатический ингибитор трипсина, фактор роста эпителия, некоторые белки оболочек бактериофагов. Однако такие случаи относительно редки и белки чаще всего содержат 100 — 400 аминокислотных остатков в одной полипептидной цепи, образующей глобулярную структуру.

Впрочем, длина полипептидной цепи может быть и гораздо большей, достигая тысячи остатков и более. Известны и так называемые *полибелки*. Они представляют собой еще более длинную полипептидную цепь, формирующую последовательно несколько вполне автономных как в структурном, так и в функциональном отношении глобул, которые после разрезания полибелка по местам "перетяжек" протеиназами существуют как независимые друг от друга ферменты. Видимо, сам по себе механизм биосинтеза не накладывает существенных ограничений на длину полипептидной цепи белка.

Следует подчеркнуть, что переход от пептида к пространственно структурированной, компактной белковой глобуле определяется не механическим удлинением полипептидной цепи, а специфической последовательностью аминокислотных остатков. Иными словами, вовсе не обязательно случайно построенная полипептидная цепь самопроизвольно образует компактную пространственную структуру. Весьма

вероятно, что способность к самосборке свойственна ограниченному кругу последовательностей, среди которых и те, что соответствуют природным белкам и отобранны в ходе эволюции. Во всяком случае известны последовательности аминокислот, не свортывающиеся в компактную структуру.

Столь большое значение, которое придают самосборке пространственной структуры как отличительному признаку белка, объясняется тем, что именно она служит основой всех свойств белка, прежде всего его биологической функции. Физические характеристики белка как полимера полностью определяются его способностью формировать компактную глобулу, от особенностей которой зависит и олигомеризация многих белков. Химические и функциональные свойства белков зависят от специфических взаимодействий функциональных групп, сближенных в его пространственной структуре. Вследствие этого поведение этих групп в белках коренным образом отличается от их реакционной способности в аминокислотах и небольших пептидах: Соответственно белок может функционировать, т.е. выступать в качестве фермента, структурного или транспортного белка, регулятора, токсина, ингибитора только потому, что он обладает вполне определенными пространственными строением.

Еще на заре современной химии белка датский биохимик К. Линдештрам-Ланг предложил рассматривать четыре уровня организации белковой молекулы: первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры. Эта классификация закрепились в литературе, поскольку в ней отразились реальные ступени формирования пространственного строения белковых молекул.

Первичной структурой называют последовательность аминокислотных остатков в молекуле белка. Она кодируется структурным геном данного белка и содержит в себе все необходимое для саморганизации его пространственной структуры. Последовательность аминокислот образуется в результате трансляции мРНК. Однако первичная структура зрелой белковой молекулы далеко не всегда полностью совпадает с непосредственным продуктом трансляции, который, как правило, подвергается более или менее существенной ко- и посттрансляционной модификации, процессингу, причем могут изменяться аминокислотные остатки, длина полипептидной цепи и т.п. (см. гл. 11).

Для определения первичной структуры белка все чаще прибегают к анализу последовательности нуклеотидов в соответствующем структурном гене или кДНК, что требует гораздо меньшего времени и дает в целом более точные результаты. Однако такой путь не всегда практичен, так как при этом необходимо выделение и клонирование гена. Кроме того, он не позволяет обнаружить посттрансляционные модифи-

кации, без выявления которых исследование структуры белка нельзя считать завершенным. Ввиду этого методы определения первичной структуры, основанные на анализе самого белка, сохраняют свое значение и продолжают совершенствоваться. Помимо полного анализа первичной структуры те же методы применяют (обычно в неполном объеме) для первичной характеристики вновь выделяемых белков; сравнения белков между собой, анализа их функционально важных фрагментов, локализации групп, подвергшихся химическому модифицированию, и т.п.

Число установленных первичных структур быстро нарастает — еще в 1965 г. их счет шел на единицы, в 1975 г. было известно около 600, в 1984 г. — 2500 последовательностей, содержащих около 0,5 млн. аминокислотных остатков, к концу 1989 г. эти цифры возросли соответственно до 14 400 и 4 млн.

4.2. ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ИНДИВИДУАЛЬНОСТИ БЕЛКА. МИКРОГЕТЕРОГЕННОСТЬ БЕЛКОВ

Определению первичной структуры белка предшествуют его очистка (см. гл. 3) и установление химической индивидуальности, или, как принято говорить, *гомогенности*. Универсальных критериев гомогенности белка нет, наиболее строгим доказательством его индивидуальности является однозначное установление первичной структуры, требующее большого труда и времени и не всегда доступное. Практически полезными, хотя и неполными, критериями индивидуальности белка служат:

— обнаружение при диск-электрофорезе или изоэлектрофокусировании единственной белковой полосы, проявляющей характерную для данного белка активность; весьма доказательны данные иммуноэлектрофореза и иммуноблоттинга;

— обнаружение при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии анионного детергента (додецилсульфата натрия) единственной полосы, отвечающей денатурированному белку, в особенности если иммуноблоттинг подтверждает, что она несет антигенные детерминанты данного белка. В случае олигомерных белков, построенных из разных субъединиц, таких полос может быть несколько, однако анализу первичной структуры должно предшествовать разделение субъединиц;

— обнаружение единственного белкового пика, достаточно симметричного и совпадающего с пиком активности при различных методах жидкостной хроматографии (аффинной, ионообменной, гидрофобной, гель-хроматографии). Существенно, чтобы соотношение активности и

содержания белка (удельная активность) оставалось постоянным по всеми пику;

— выявление единственной аминоконцевой последовательности. К идентификации аминоконцевого остатка для этой цели прибегают редко, так как расход белка для получения столь ограниченной информации оказывается неоправданно большим.

Эти приемы не единственны и не обязательны, доказательство индивидуальности строится по-новому для каждого белка. Нередко при этом обнаруживается так называемая *микрөгетерогенность* белка, вызываемая, как правило, неоднозначностью посттрансляционных модификаций или случайными повреждениями белковых молекул *in vivo* или в процессе выделения. Возможна, впрочем, и гетерогенность, обусловленная функционированием аллельных генов, или альтернативным сплайсингом.

Среди наиболее частых причин микрөгетерогенности укажем *внутренние разрывы полипептидной цепи* за счет случайного действия протеиназ, так называемые *растрепанные концы* (результат неоднозначного процессинга аминоконцевого участка белка), а также *дезамидирование* отдельных остатков аспарагина, реже глутамина. Последнее может происходить спонтанно, в особенности легко — в последовательности Asp—Gly и приводит к так называемой *микрөгетерогенности по заряду*. Известна микрөгетерогенность за счет неполноты фосфорилирования белка протеинкиназами или различий в структуре углеводных цепей гликопротеинов.

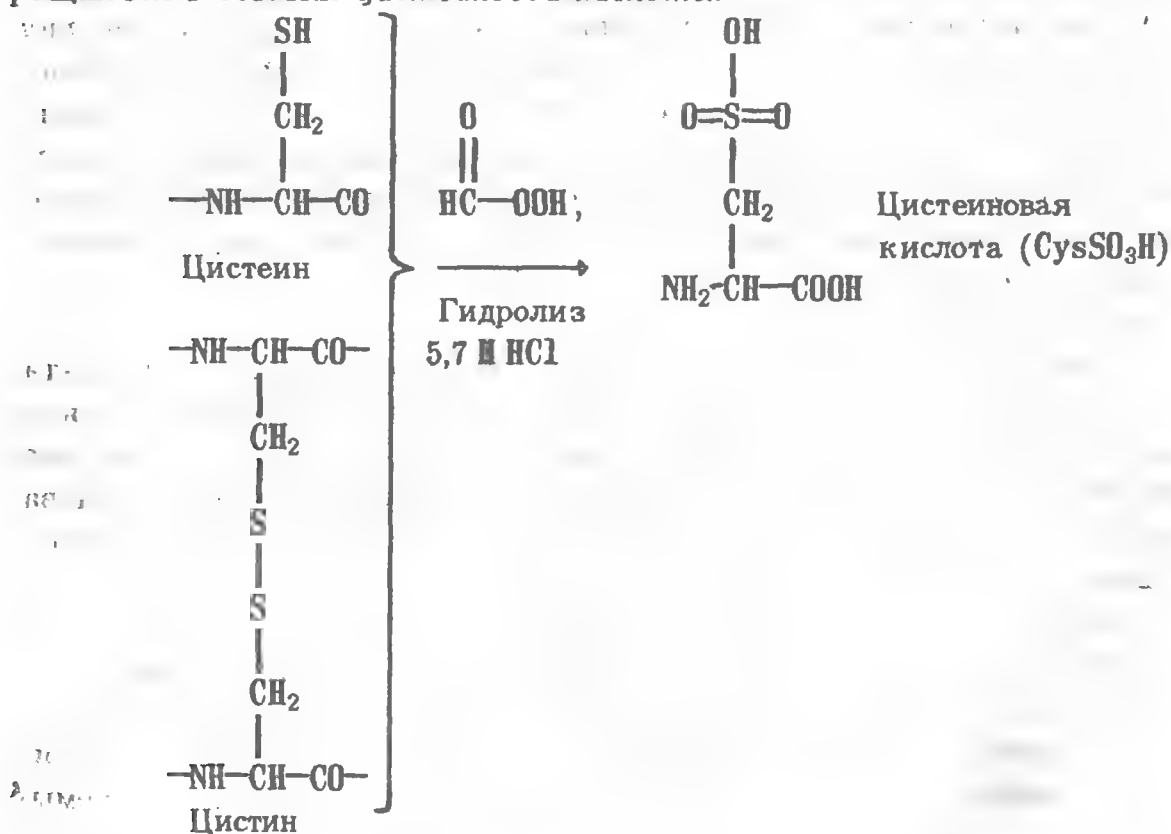
Высказываемые иногда предположения о микрөгетерогенности, обусловленной существованием стабильных конформеров белка с одинаковой первичной структурой, экспериментального подтверждения не получили и труднообъяснимы теоретически. Многие виды микрөгетерогенности не препятствуют определению аминокислотной последовательности, однако осложняют анализ и должны учитываться при его проведении.

4.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКА

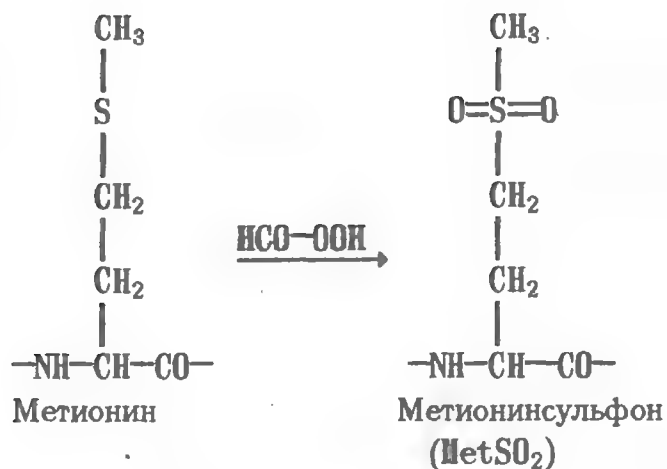
Определение аминокислотного состава необходимо для характеристики исследуемого белка, а также пептидных фрагментов, получаемых в ходе анализа первичной структуры. Для расщепления до свободных аминокислот пептид или белок подвергают исчерпывающему гидролизу, нагревая его с постоянной кипящей (5,7 М) HCl при 105 °C в течение 24 ч. Поскольку в таких условиях пептидные связи остатков изолейцина и валина гидролизуются неполно, проводят также 48- и 72-часовой гидролиз. В то же время серин и треонин недостаточно

устойчивы и заметно (примерно на 10%) расщепляются уже за 24 ч. Ввиду этого для получения более надежных величин содержание валина и изолейцина оценивают, экстраполируя найденные значения к "бесконечному" времени, а содержание серина и треонина определяют экстраполяцией к "нулевому" времени гидролиза.

Некоторые аминокислоты вообще не выдерживают кислотного гидролиза и разрушаются практически полностью, поэтому для их определения требуются специально разработанные приемы. Прежде всего полностью гидролизуются до свободных *аспарагиновой* и *глутаминовой кислот* их амиды — *аспарагин* и *глутамин*. Методы их прямого определения в белках до сих пор не разработаны. Для определения *триптофана* гидролиз белка проводят метансульфоной кислотой $\text{CH}_3\text{—SO}_3\text{H}$ в присутствии триптамина, защищающего индольное кольцо триптофана от деструкции. Для определения *суллы цистина* и *цистеина* белок перед гидролизом подвергают окислению надмуравьиной кислотой HCO—OOH , в результате чего эти остатки превращаются в остатки *цистеиновой кислоты*:



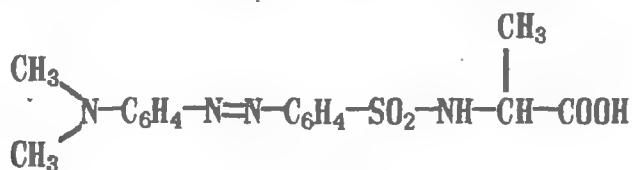
Поскольку определение последней не позволяет судить о содержании отдельно остатков цистина и цистеина, данные аминокислотного анализа выражают в остатках "полуцистина". Окисление надмуравьиной кислотой превращает также остатки *метионина* в метионинсульфон, не разрушающийся при гидролизе в отличие от метионина:



Для количественного определения аминокислот в кислотном гидролизате белка или пептида используют *автоматические анализаторы*, впервые описанные У.Стейном, С.Муром и Д.Спекмэном. Их конструкции весьма разнообразны, однако все они основаны на хроматографическом разделении аминокислот на сульфополистирольных катионитах. Элюция аминокислот происходит в порядке, который определяется, во-первых, их кислотно-основными свойствами (аспарагиновая и глутаминовая кислоты элюируются в числе первых; гистидин, лизин и аргинин — последними); во-вторых, гидрофобными взаимодействиями боковых радикалов с полистирольной матрицей ионита (гидрофильные серин и треонин элюируются рано; глицин, аланин, валин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин — примерно в порядке возрастания гидрофобности).

В элюате автоматически проводится цветная реакция аминокислот с *нитидрином* (см. гл. 1), на которой и основано их количественное определение. Такой способ позволяет определять до 1—10 пмоль аминокислоты. Более чувствительно измерение флуоресценции продукта реакции аминокислот с *о*-фталевым альдегидом (см. гл. 1), позволяющим определять менее 1 пмоль.

Развивается новый подход к определению аминокислотного состава, при котором аминокислоты превращают в производные, интенсивно поглощающие свет в ультрафиолетовой или видимой области спектра, например в фенилтиокарбамил- (см. гл. 1) или *p*-диметиламинофенилазофенилсульфонил ("дабсил")-производные:



Дабсил-аланин

Эти производные разделяют высокоэффективной жидкостной хроматографией на колонках, содержащих C_{18} -производные кремнезема, и определяют содержание аминокислот спектрофотометрически. Метод обладает высокой чувствительностью и скоростью, позволяя определять доли пикомоль — *фемтомоли* аминокислот.

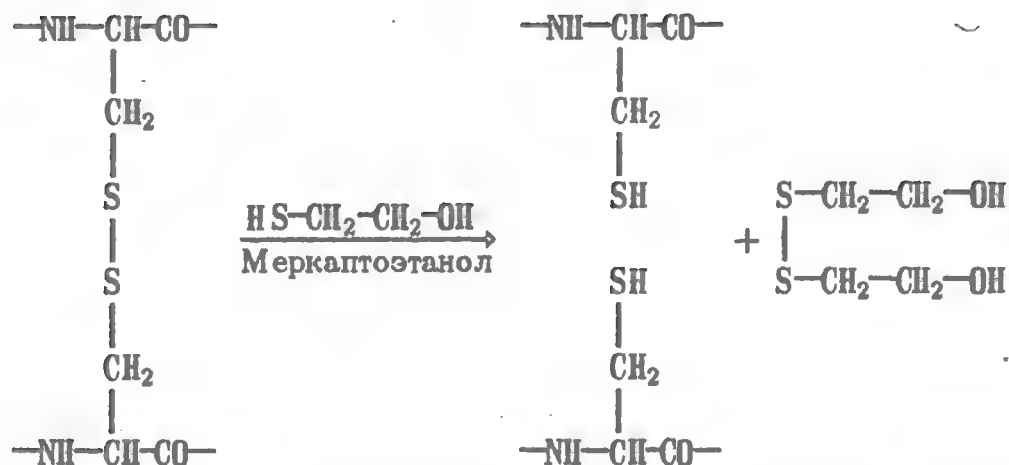
Оценивая результаты аминокислотного анализа белков и пептидов, необходимо учитывать ограничения, связанные прежде всего с относительной неточностью ("грубостью") кислотного гидролиза белков. К сожалению, надежный метод полного ферментативного гидролиза белков, который был бы лишен этого недостатка, до сих пор не разработан. Точность самого метода определения аминокислот, как правило, заметно выше — порядка 2—3%. Учитывая это, следует с осторожностью относиться, например, к данным о небольших (в 1—2 остатка) различиях в составе белков, поскольку они не выходят за пределы возможных погрешностей метода, особенно если речь идет о "трудных" для определения аминокислотах, разрушающихся при гидролизе, образующих трудно расщепляемые пептидные связи или дающих низкий выход окраски при реакции с нингидрином (например, пролин).

4.4. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

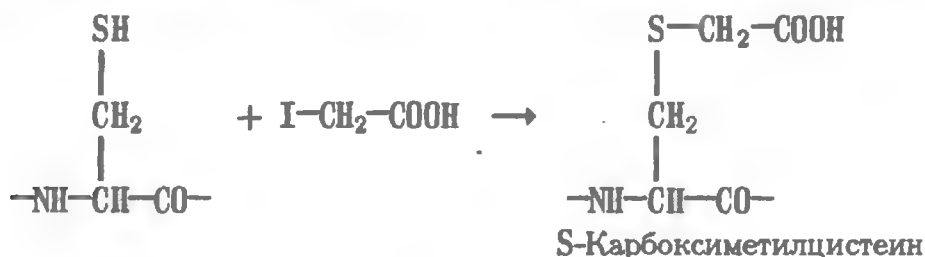
4.4.1. Подготовка белка к анализу

Подготовка белка к анализу первичной структуры призвана свести к минимуму влияние других, более высоких уровней его организации. Иными словами, объектом анализа должна быть *неупорядоченная полипептидная цепь* без каких-либо поперечных ковалентных связей (например, дисульфидных мостиков) так, чтобы все ее звенья, все пептидные связи были в равной мере доступны действию как химических реагентов, так и ферментов. К сожалению, в полной мере исключить помехи со стороны свойственных белку нековалентных взаимодействий не удастся, однако разработаны приемы, позволяющие приблизиться к этой цели.

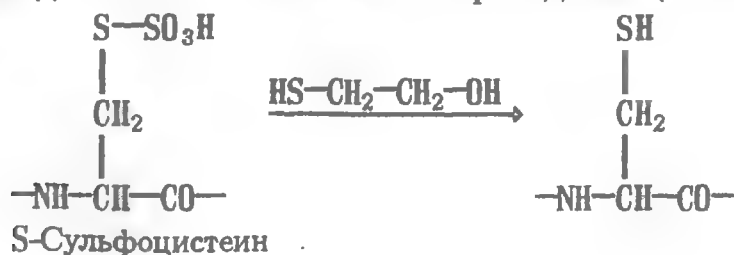
Итак, белок должен быть прежде всего подвергнут глубокой *денатурации* и утратить четвертичную, третичную и по возможности вторичную структуру. Если в нем имеются *дисульфидные связи*, прибегают к их расщеплению, используя, как правило, восстановление большим избытком меркаптосоединения, например дитиозритрита или меркаптоэтанола:



Эта реакция, которую обычно проводят в условиях, обеспечивающих денатурацию белка (в 8 М растворе мочевины или в 6 М гидрохлориде гуанидина при pH 8—9), имеет своим результатом превращение остатка цистина в два остатка цистеина со свободными сульфгидрильными группами. Сохранять такое производное и тем более использовать его для последующих превращений нельзя, так как после удаления избытка восстановителя, что обычно достигается гель-фильтрацией смеси, вновь произойдет замыкание дисульфидных связей за счет окисления свободных SH-групп кислородом воздуха. Во избежание этого *сульфгидрильные группы блокируют*, обрабатывая восстановленный и денатурированный белок *избытком иодуксусной кислоты*, которая переводит остатки цистеина в устойчивый *S-карбоксиметилцистеин*:



Такое превращение необратимо. Если желательна последующая регенерация остатков цистеина, прибегают к получению S-сульфопродуктов, обрабатывая белок сульфитом натрия в присутствии ионов меди. Получающийся при этом *S-сульфоцистеин* при действии избытка меркаптосоединений количественно переходит в цистеин:



Несмотря на совершенствование автоматических методов определения первичной структуры, даже в благоприятных случаях редко удается в одной цепи за один прием определить последовательность более чем 50 аминокислотных остатков. Этого достаточно для исследования небольших белков, в остальных же случаях необходимо прибегать к фрагментации полипептидной цепи несколькими методами, с тем чтобы получить систему перекрывающихся пептидов. Определение их строения и сопоставление полученных данных приводят к установлению последовательности аминокислот всей полипептидной цепи белка.

Известны ферментативные и химические методы специфического расщепления полипептидной цепи.

4.4.2. Ферментативные методы фрагментации полипептидной цепи

При выборе протеолитических ферментов, подходящих для избирательного гидролиза белка, особенно важна их *специфичность*. Как правило, пользуются так называемой *первичной специфичностью* протеиназ, т.е. их способностью преимущественно атаковать пептидные связи, образованные тем или иным аминокислотным остатком. Аминокислотные остатки субстрата принято обозначать латинской буквой Р с индексами, соответствующими номеру остатка, считая от расщепляемой связи к аминному концу ("влево"). Остатки, расположенные в сторону карбоксильного конца ("вправо" от гидролизуемой связи) обозначают Р' с соответствующим индексом:



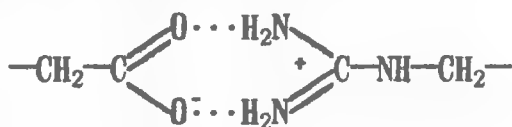
Если использовать эти обозначения, то первичной специфичностью следует считать способность той или иной протеиназы избирательно расщеплять пептидные связи, образованные остатками P_1 и P'_1 . Все протеиназы, однако, имеют более или менее выраженную *вторичную специфичность*: скорость расщепления ими пептидной связи зависит не только от строения той аминокислоты, которая прямо участвует в ее построении своей карбоксильной или аминной группой (т.е. остатка P_1 и P'_1), но и от соседних аминокислотных остатков P_2 , P_3 , P'_2 , P'_3 и т.д. Обычно в образовании комплекса с ферментом участвует не менее 5—6 аминокислотных остатков (см. гл. 10).

Влияние вторичной специфичности уменьшают, проводя гидролиз достаточно долго, так, чтобы расщепились и те пептидные связи, которые находятся в невыгодном для данного фермента окружении. Специфичность протеиназ редко бывает совершенно строгой: наблюда-

ется и расщепление не характерных для данного фермента связей, нарастающее со временем. Все это требует оптимизации условий ферментативного гидролиза полипептидных цепей.

В настоящее время для специфического гидролиза белков при определении первичной структуры наиболее часто применяют следующие протеиназы.

Трипсин. Это фермент поджелудочной железы животных, который принадлежит классу так называемый *сериновых протеиназ* и специфически гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами остатков *аргинина* или *лизина* ($P_1 = \text{Arg, Lys}$). Боковые цепи этих аминокислот несут на определенном расстоянии от α -углеродного атома положительно заряженную катионную группу. Показано, что в зоне связывания субстрата последняя входит во впадину, где расположена отрицательно заряженная β -карбоксильная группа одного из остатков аспарагиновой кислоты трипсина:



Карбоксил остатка аспарагиновой кислоты в зоне связывания субстрата трипсина

Гуанидогруппа боковой цепи аргинина в субстрате трипсина

Электростатическое взаимодействие между катионной и анионной группами играет определяющую роль в специфичности трипсина. Это подтверждается тем, что замена аспарагиновой кислоты в зоне связывания субстрата другим остатком приводит к утрате способности гидролизовать пептидные связи аргинина или лизина.

Блокирование ϵ -аминогрупп лизина в атакуемом трипсином полипептиде, например ацилированием цитраконовым ангидридом (см. гл. 9), приводит к замене катионной аминогруппы на анионную (карбоксилатную), поэтому в соответствующем производном трипсин расщепляет только пептидные связи аргинина. Это позволяет получить более крупные фрагменты белка, которые после их выделения из гидролизата выдерживают в слабокислом растворе, что вызывает отщепление остатка цитраконовой кислоты и высвобождение ϵ -аминогрупп лизина. Затем такие пептиды с регенерированными остатками лизина вновь расщепляют трипсином.

Аналогично можно регулировать доступность пептидных связей аргинина гидролизу трипсином. Для этого блокируют гуанидогруппу аргинина, обрабатывая белок в щелочной среде дикетоном, например диацетиллом, закрепляя образующийся при этом диол образованием комплекса с борной кислотой (см. гл. 9).

При гидролизе белка трипсином обычно используют pH, близкий 8, температуру 37 °C и весовое соотношение фермент — субстрат 1:100, регулируя полноту гидролиза временем реакции. Нередко при гидролизе трипсином расщепляются отдельные пептидные связи, соответствующие специфичности родственного фермента — *химотрипсина*. Это может объясняться присутствием в препарате трипсина примеси химотрипсина или продуктов ограниченного гидролиза трипсина, однако и вполне чистый трипсин может сам по себе обнаруживать не характерную для него специфичность.

Химотрипсин. *Сериновая протеиназа* поджелудочной железы, структурно родственная (гомологичная) трипсину. Химотрипсин специфически гидролизует (оптимум pH вблизи 8) пептидные связи, образованные карбоксильными группами *ароматических аминокислот* — фенилаланина, тирозина, триптофана и нередко лейцина, сравнимого с этими остатками по гидрофобности ($P_1 = \text{Phe, Tyr, Trp, Leu}$).

Термоллизин. *Металлопротеиназа*, секретируемая клетками термофильной бактерии *Bacillus amyloliquefaciens*. Этот фермент, имеющий ион цинка в активном центре, оптимально активен при pH 6—8 и избирательно гидролизует пептидные связи, образованные с участием аминокислот *гидрофобных аминокислот* — лейцина, фенилаланина, тирозина, валина, изолейцина ($P_1' = \text{Leu, Phe, Tyr, Val, Ile}$). Фермент может применяться даже при 60—80 °C.

Glu, Asp-специфичные протеиназы (эндопротеиназы Glu—C). *Сериновые протеиназы Staphylococcus aureus*, а также некоторых стрептомицетов и термоактиномицетов. Ферменты гидролизуют пептидные связи, образованные α -карбоксильными группами остатков *глутаминовой кислоты*, значительно реже *аспарагиновой кислоты* ($P_1 = \text{Glu, Asp}$). Имеют в зависимости от субстрата и состава буферного раствора два оптимума pH: при 4 и 8. Характерная для этих протеиназ и весьма строго выдерживаемая специфичность хорошо дополняет специфичность других протеолитических ферментов, поэтому они все шире применяются в анализе структуры.

Эндопротеиназа Lys-C. Протеолитический фермент из *Lysobacter enzymogenes*, специфически гидролизующий пептидные связи, образованные карбоксильной группой *лизина*, но не аргинина ($P_1 = \text{Lys}$).

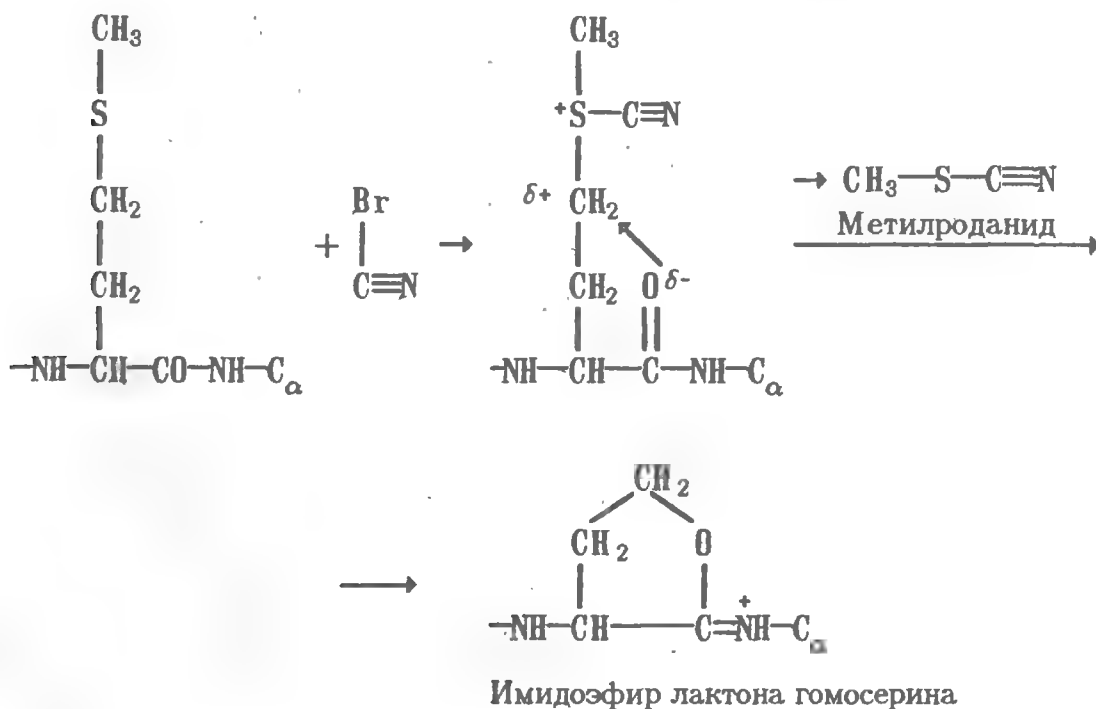
Эндопротеиназа Arg-C. Протеиназа из подчелюстной железы мыши, избирательно расщепляющая пептидные связи, образованные с участием карбоксильной группы *аргинина* ($P_1 = \text{Arg}$).

Можно предполагать, что будут найдены и войдут в практику фрагментации белков и другие протеолитические ферменты с четко определенной специфичностью.

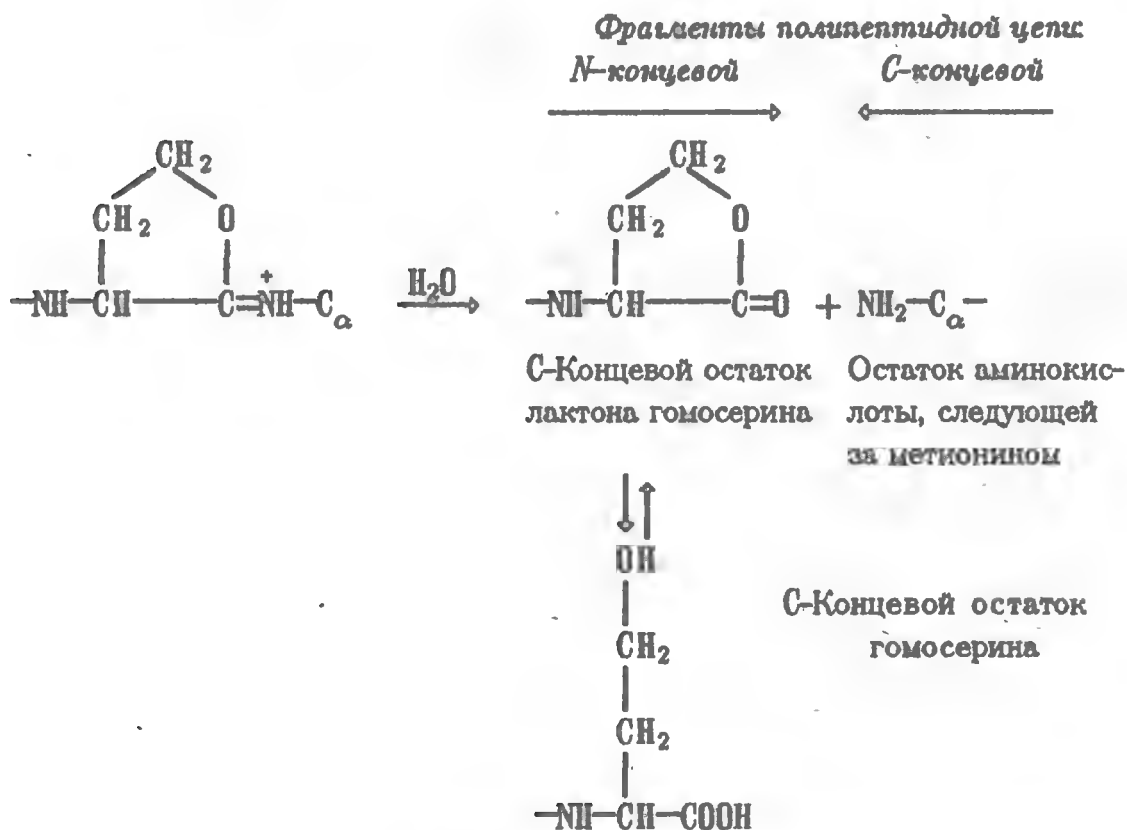
4.4.3. Химические методы специфического расщепления пептидных связей

Из множества предлагавшихся в различное время методов избирательного химического расщепления пептидных связей наибольшее распространение в практике анализа первичной структуры получило *расщепление бромцианом*, проводимое обычно в муравьиной или трифторуксусной кислоте. Эта реакция ведет к *расщеплению пептидных связей*, образованных с участием карбоксильной группы остатков *метионина*. Бромциан реагирует с серой тиоэфирной группы метионина, образуя сульфониевую соль. В этом промежуточном продукте положительный заряд на атоме серы индуцирует возникновение частичного положительного заряда ($\delta+$) на соседнем γ -атоме углерода боковой цепи метионина. Возникший таким образом на γ -углероде электрофильный центр подвергается атаке кислородным атомом карбонильной группы, на котором постоянно существует частичный отрицательный заряд, усиливающийся во время реакции, что обусловлено поляризацией связи $C=O$.

В результате смещение электронной плотности в этой группе и во всей пептидной связи завершается образованием ковалентной связи между γ -углеродным атомом и атомом кислорода, двойная связь $C=O$ переходит в простую, а связь $C-N$ пептидной группы, обычно частично двойная, становится полностью двойной с переносом положительного заряда на ее атом азота:



Одновременный разрыв связи S—CH₂ освобождает летучий метилроданид. Получившееся в результате внутримолекулярной реакции производное имидозифира лактона гомосерина легко гидролизуется с разрывом связи C—N, что и завершает специфическое расщепление пептидной связи остатка метионина. На С-конце вновь образовавшегося пептидного фрагмента оказывается остаток гомосерина или его лактон, легко превращающиеся друг в друга:



Метод расщепления бромцианом достаточно избирателен, затруднения встречаются лишь в тех случаях, когда за остатком метионина следуют серин или треонин. Характерно, что к расщеплению пептидных связей бромцианом прибегают при "вырезании" из гибридных генно-инженерных конструкций пептидов или небольших белков, встроенных в структуру белка-хозяина для лучшей экспрессии в бактериальных клетках.

Среди других методов химического расщепления пептидной связи следует упомянуть более или менее избирательное *выщелечение остатков аспарагиновой кислоты* при кратком нагревании белка или пептида в слабокислом растворе. Видимо, внутримолекулярный катализ с участием β-карбоксильной группы аспарагиновой кислоты, которая может быть сближена с обеими пептидными связями, образованными

этим остатком, ответствен за преимущественный гидролиз именно этих связей. В еще более мягких условиях при выдерживании в кислых растворах избирательно расщепляются пептидные связи Asp—Pro.

Описаны также методы специфического расщепления пептидных связей триптофана, цистеина и пролина, однако они нашли лишь весьма ограниченное применение.

4.4.4. Разделение пептидов, полученных фрагментацией полипептидной цепи

Разделение смесей пептидов, получаемых в результате ферментативного или химического расщепления полипептидной цепи белка, составляет одну из наиболее сложных, не стандартных, стадий анализа первичной структуры. Традиционная схема разделения состояла из большого числа стадий и, следовательно, была сопряжена с очень большими потерями пептидов, причем ведущую роль играла ионообменная хроматография пептидов чаще всего на сульфополистирольных катионитах с элюцией в градиенте pH. Метод дополняли гель-фильтрацией, хроматографией и электрофорезом на бумаге или тонкослойной хроматографией.

В последние годы доминирует *фракционирование пептидов высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на сорбентах с "обращенной фазой"*. Последние представляют собой мелкие частицы кремнезема с большой поверхностью, к которой ковалентно присоединены углеводородные цепи различной длины. Разделение на таких сорбентах определяется гидрофобными взаимодействиями между этими цепями, содержащими 4, 8, иногда 18 углеродных атомов (C₄, C₈, C₁₈), и гидрофобными элементами в структуре пептидов. Определенную роль играют и ионообменные эффекты. Пептиды элюируют при высоких давлениях — порядка 100 атм, используя градиент концентрации органических растворителей с различной десорбирующей способностью (метанол, ацетонитрил, изопропанол, диоксан), к которым для регулирования pH прибавляют трифторуксусную кислоту или буферные смеси.

Хорошие результаты дает также ионообменная хроматография на мелкозернистых ионитах типа Моно-Q и Моно-S (см. гл. 3) с использованием давления порядка 20 атм. Эти методы, обладающие высокой разрешающей способностью, позволили резко сократить число стадий выделения индивидуальных пептидов, снизить их потери и перейти к анализу первичной структуры очень малых (порядка сотен наномоль) количеств белка.

4.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДОВ

4.5.1. Определение С-концевых аминокислот

Определение С-концевых аминокислот и последовательностей пептидов разработано недостаточно. Единственным химическим методом идентификации С-концевых аминокислот, получившим распространение, является исчерпывающий *гидразинолиз* пептидных связей. При нагревании совершенно сухого препарата белка или пептида с безводным гидразином все пептидные связи расщепляются им с образованием соответствующих *гидразидов аминокислот*:



Последние, будучи основаниями (кроме α -гидразидов дикарбоновых аминокислот), легко отделяются (например, ионообменной хроматографией в условиях обычного аминокислотного анализа) от единственной свободной аминокислоты, содержащейся в продуктах гидразинолиза, которая и является С-концевым остатком.

Ферментативный метод, позволяющий не только идентифицировать С-концевой остаток, но и определить С-концевую последовательность небольшой длины, основан на последовательном отщеплении аминокислот от карбоксильного конца пептида (или белка) при действии карбоксипептидаз.

Карбоксипептидаза А. Фермент поджелудочной железы животных, содержащий ион цинка в активном центре. Активен в слабощелочной или нейтральной среде. Являясь *экзопептидазой*, фермент отщепляет от карбоксильного конца полипептидной цепи нейтральные и особенно легко *гидрофобные аминокислоты*. Труднее отщепляются остатки дикарбоновых аминокислот, еще труднее глицин и остатки, за которыми следует пролин. Не отщепляются вовсе пролин и остатки аргинина и лизина.

Карбоксипептидаза В. Также содержится в поджелудочной железе и гомологична карбоксипептидазе А, от которой отличается главным образом специфичностью, отщепляя *С-концевые остатки аргинина и лизина*.

Карбоксипептидаза Y (от англ. yeasts — дрожжи). Содержится в клетках дрожжей. Имеет остаток *серина в акционном центре* и обладает весьма широкой специфичностью, отщепляя почти любые аминокислотные остатки (в том числе и остатки пролина) от карбоксильного конца полипептидной цепи. Аналогичные ферменты выделены из грибов и растений.

При действии карбоксипептидаз на пептидный или белковый субстрат после отщепления С-концевого остатка хотя бы от части молекул открывается возможность высвобождения из цепи следующего остатка, затем третьего с С-конца и т.д. Ввиду этого для определения С-концевой последовательности необходимо количественно определить накопление аминокислот в зависимости от времени реакции. Анализ данных дополнительно осложняется весьма значительными различиями в скорости отщепления аминокислот, отражающими специфичность фермента. Так, гидрофобные аминокислоты настолько легко отщепляются карбоксипептидазой А, что их количество нередко оказывается почти таким же, как и содержание ранее отщепившихся гидрофильных остатков, пептидные связи которых гидролизуются гораздо медленнее. Скорость гидролиза зависит и от природы аминокислот, предшествующих отщепляемому остатку P_1' остатков — P_1 , P_2 и т.д.

Таким образом, метод обычно дает возможность определить чередование лишь немногих, обычно 2—5, аминокислотных остатков на карбоксильном участке пептида.

4.5.2. Определение N-концевых аминокислот и последовательностей

Методы анализа пептидов с аминного конца разработаны значительно лучше, чем с карбоксильного, и являются основными при определении первичной структуры белков.

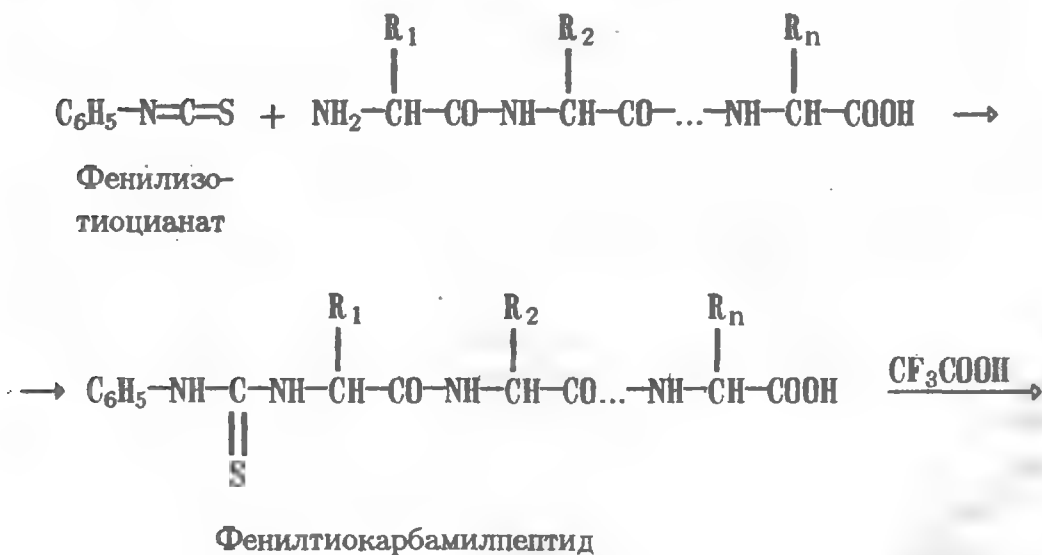
Идентификация N-концевой аминокислоты важна как одно из доказательств индивидуальности пептида или белка. Классическим является применение для этой цели реакции *динитрофенилирования*. *Динитрофторбензол* реагирует с α -аминогруппой белка или пептида с образованием окрашенного в желтый цвет ($\lambda_{\max} \approx 350 \div 360$ нм, молярная экстинкция около 15 000) 2,4-динитрофенил (Dnp)-производного (см. гл. 1). Одновременно в реакцию вступают и ϵ -аминогруппы остат-

ков лизина, и гидроксильные группы тирозина. Затем динитрофенил-производное гидролизуют 5,7 М HCl при 105°C, причем расщепляются все пептидные связи, но сохраняются Dnp-аминокислоты (кроме производных глицина и пролина). Их выделяют из гидролизата и идентифицируют.

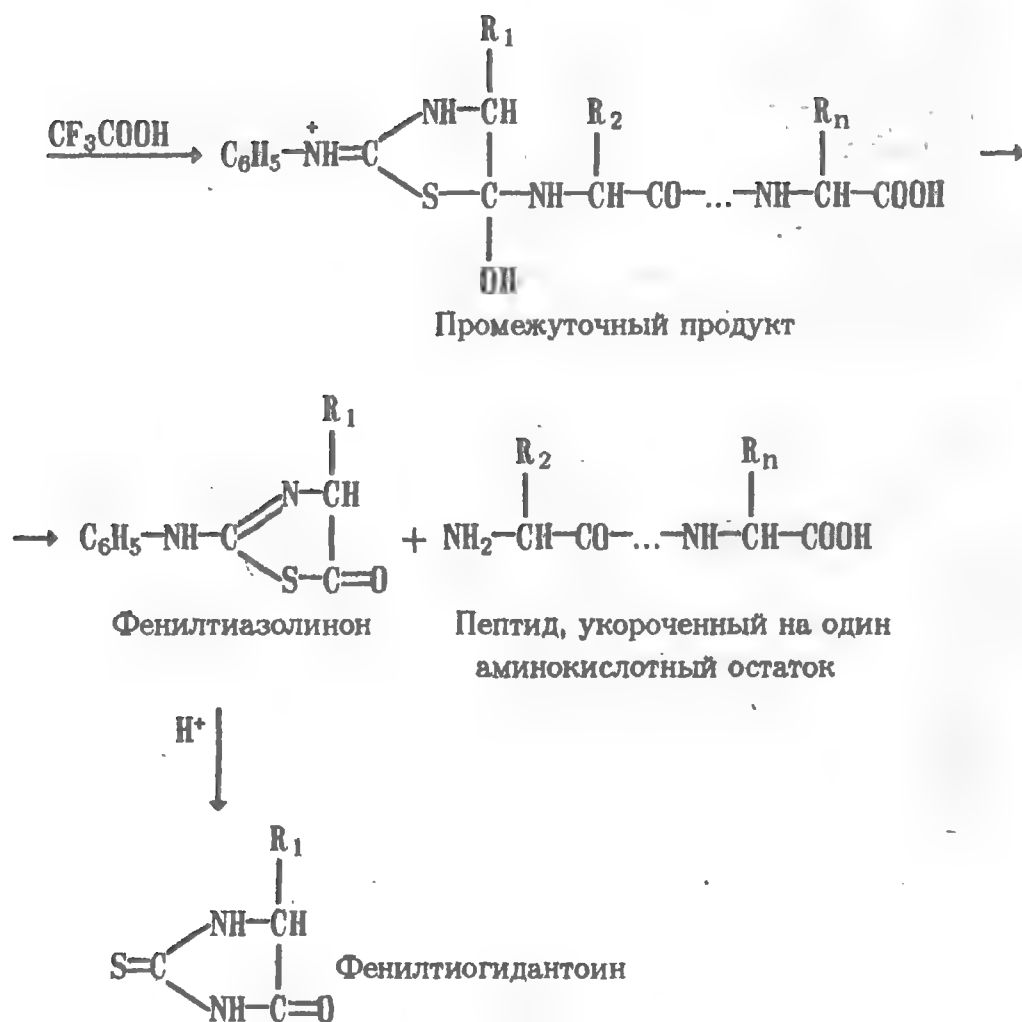
Метод почти полностью вытеснен так называемым *дансильным методом*. В этом случае в качестве реагента на аминогруппу используют 5-диметиламинонафталин-1-сульфохлорид (*дансилхлорид*) (см. гл. 1). Кислотный гидролиз полученного дансилпептида дает дансил-производное N-концевой аминокислоты, которое идентифицируют двумерной хроматографией на полиамидных пленках. Анализ облегчается интенсивной флуоресценцией дансил-производных в ультрафиолетовом свете, что обеспечивает высокую чувствительность метода, позволяющего работать с количествами пептида порядка нескольких наномоль.

Наиболее продуктивно определение N-концевой последовательности в пептидах и белках *фенилтиогидантоиновым методом ступенчатого отщепления аминокислотных остатков*, предложенным П.Эдманом. Метод основан на следующей цепи реакций.

Обрабатывая пептид в щелочной среде *фенилизотиоцианатом*, его превращают в *фенилтиокарбамил-производное*:



Смысл этой операции состоит во введении нуклеофильного атома серы в положение, благоприятствующее реакции с углеродом карбонильной группы N-концевого остатка, которая происходит на следующей стадии при обработке фенилтиокарбамил-производного трифторуксусной кислотой:



Результатом этой атаки является образование гипотетического промежуточного продукта, в котором атом углерода карбонила N-концевого остатка приобрел тетраэдрическую конфигурацию. Далее происходит разрыв связи C—N в этом соединении, причем образуются циклический *фенилтиазаолинон* (производное аминоконцевого остатка) и пептид, укороченный на одну аминокислоту.

Фенилтиазаолиноны недостаточно устойчивы, поэтому их подвергают, предварительно отделив от остаточного пептида, более жесткой кислотной обработке при нагревании и переводят в стабильные *фенилтиогидантоины*. Последние идентифицируют тонкослойной хроматографией на полиамидных пленках, газожидкостной или высокоэффективной жидкостной хроматографией.

Образовавшийся после отщепления N-концевого остатка остаточный пептид вновь обрабатывают фенилизотиоцианатом и подвергают далее такому же циклу превращений, отщепляя на этом шаге вторую аминокислоту, считая с аминного конца. Повторение циклов приводит к ступенчатому отщеплению последующих аминокислотных остатков.

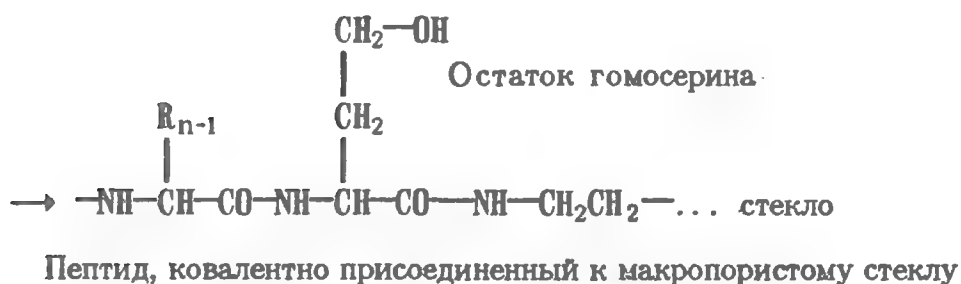
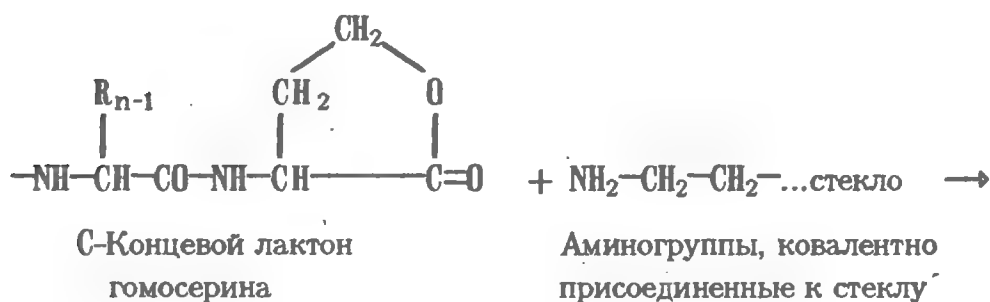
Используется также вариант метода Эдмана, при котором идентифицируют не фенилтиогидантоин или другое производное аминокислоты, отщепленной в данном цикле, а следующий за ней остаток, прибегая для этого к определению N-концевой аминокислоты в небольшой доле (аликвоте) остаточного пептида методом дансирования. Остальную, главную, часть остаточного пептида вводят в новый цикл деградации по Эдману, затем вновь определяют N-концевую аминокислоту в остаточном пептиде, укороченном уже на два остатка, и т.д. Такой способ позволяет обычно определить последовательность 10—15 аминокислот.

Гораздо большие возможности открыла автоматизация метода Эдмана: разработаны специальные приборы — автоматические секвенаторы белков и пептидов, основанные на его использовании. В одном из видов секвенатора пленку белка или пептида наносят на внутреннюю стенку быстро вращающегося стеклянного стаканчика, который затем используется как реактор. В него последовательно вводят фенилизотиоцианат, гептафтормасляную кислоту (высококипящий аналог трифторуксусной кислоты) и проводят циклизацию. Затем внутрь стаканчика подают ток 1-хлорбутана, который, распределяясь под действием центробежной силы по его внутренней стенке, экстрагирует отщепившийся фенилтиазолин. Экстракт отводят из стаканчика и в отдельной операции превращают фенилтиазолин в фенилтиогидантоин. Укороченный белок или пептид остается в виде пленки на стенке стаканчика и далее подвергается следующему циклу отщепления по Эдману и т.д.

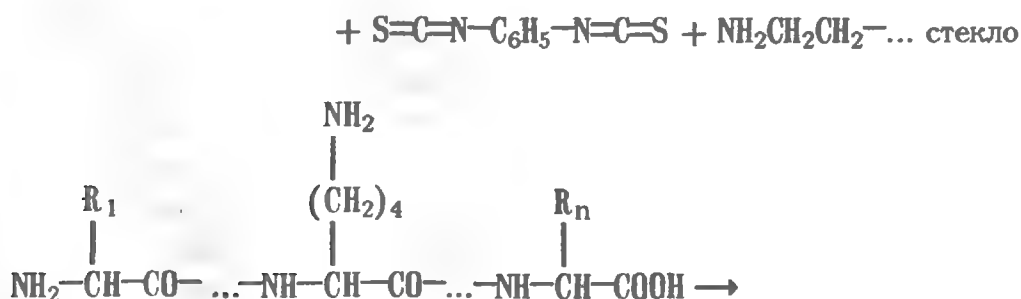
Все операции, включая подачу реагентов и промывание осадка белка или пептида, программированы. Прибор позволяет за сутки проделать 15 циклов отщепления. Выход фенилтиазолина на цикле обычно близок к 95—99%, что позволяет определить за один опыт последовательность в 20—50, а иногда и больше аминокислотных остатков, используя весьма малые, порядка сотен наномоль, количества белка или пептида.

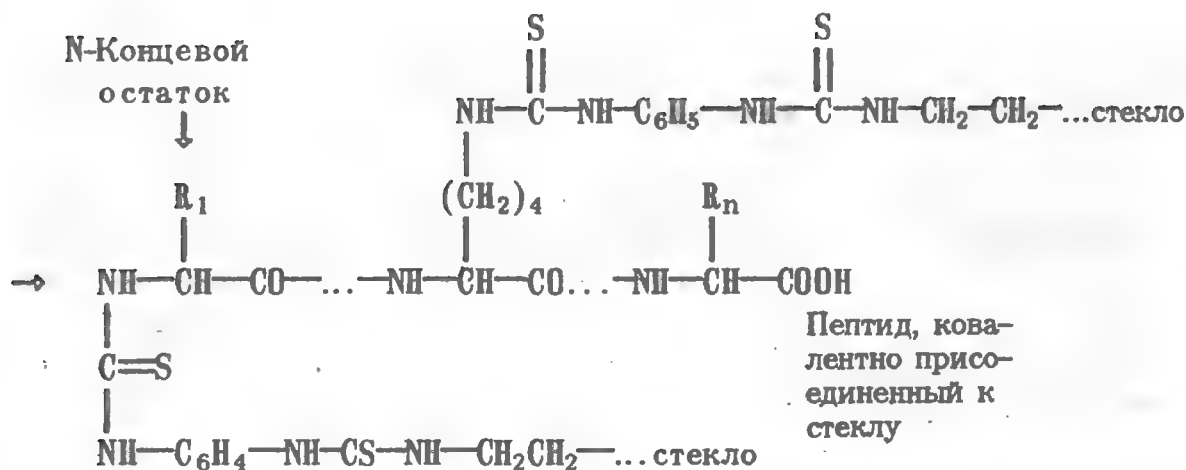
Метод ограничивают побочные реакции, например образование пироглутаминовой кислоты из N-концевого глутамина, α - β -перегруппировка остатков аспарагиновой кислоты и в особенности неспецифическое расщепление пептидных связей при кислотной обработке. Неполное протекание реакции с фенилизотиоцианатом или циклизации влечет за собой постепенное "отставание" части пептидных цепей от общего хода отщепления аминокислот, вследствие чего на каждом шаге в анализируемой смеси появляются наряду с фенилтиогидантоином соответствующей аминокислоты более или менее значительные примеси фенилтиогидантоинов от предыдущих циклов отщепления.

Ввиду этого при анализе протяженных последовательностей чрезвычайно важно, чтобы каждый цикл протекал с выходом, близким количественному. Существенным ограничением являются потери остаточного белка или пептида, в особенности короткого за счет его растворения в используемых реагентах. Радикальный способ борьбы с такими потерями состоит в ковалентном присоединении к инертной матрице, например к макропористому стеклу, содержащему аминные группы. К такому носителю удастся присоединить пептиды, полученные при расщеплении бромцианом за счет реакции лактона гомосерина с аминогруппами:



Пептиды, содержащие остатки лизина, присоединяют к аминогруппам на поверхности стекла при помощи реакции с бифункциональным сшивающим реагентом, например *p*-фенилендиизоцианатом:





Этот реагент образует мостики между носителем и остатками лизина в пептиде, но одновременно блокирует и α -аминогруппу первого аминокислотного остатка. Однако после кислотной обработки N-концевой остаток отщепляется от пептида, хотя и остается связанным со стеклом. При этом открывается аминогруппа второго аминокислотного остатка и становится возможным ступенчатое отщепление последующих аминокислот, хотя остатки лизина, прочно связанные с носителем, ускользают от анализа и "пропускаются". Идентификацию первого аминокислотного остатка проводят в отдельном опыте дансильным методом. Такие "твердофазные" секвенаторы применяют при анализе пептидов и небольших белков.

В еще одном типе секвенаторов — *газофазном* — принципиально те же реакции проводят с белком, сорбированным на пористой подложке, обрабатывая его парами реагентов и прибегая к жидкостной экстракции лишь для отделения фенилтиазолинонов. Это еще более снижает потери образца и дает возможность определять весьма протяженные последовательности, используя сотни пикомоль белков и крупных пептидов. Удастся даже определять N-концевые последовательности в тех небольших количествах белков, которые содержатся в зонах, вырезанных из геля после электрофоретического разделения.

Методом Эдмана установлено подавляющее большинство последовательностей аминокислот при анализе первичной структуры белков.

ГЛАВА 5 ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА

Вторичной структурой называют пространственное расположение атомов главной цепи молекулы белка на отдельных ее участках.

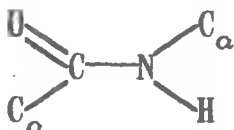
В соответствии с этим определением любой участок белка имеет вторичную структуру. Иногда рассматривают как вторичную структу-

ру только те ее элементы, которые являются *периодическими*: α -спираль и β -структуру. Однако в белках нередко встречаются такие участки пептидной цепи, которые уложены вполне определенным способом, хотя их пространственная структура не содержит какого-либо периодически повторяющегося, регулярного мотива. Тем не менее к ним вполне приложимо понятие вторичной структуры. Следует различать два вида вторичных структур: *регулярные* и *нерегулярные*.

Понятие вторичной структуры, как подчеркивается в его определении, относится не ко всей белковой молекуле в целом, а к *отдельным*, более или менее протяженным *участкам* ее полипептидной цепи. Обсуждая вторичную структуру, мы, по крайней мере на первых порах, абстрагируемся от дальних взаимодействий в молекуле белка, а также от вклада боковых групп аминокислотных остатков, концентрируясь на главной цепи белка. Ближние взаимодействия, которым принадлежит важнейшая роль в формировании вторичной структуры, определяются прежде всего особенностями пептидной связи.

5.1. СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ

Пептидной называют связь, образованную α -аминной и α -карбоксильной группами аминокислот. Традиционное изображение пептидной связи

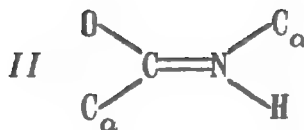
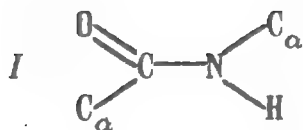


не вполне правильно передает ее электронную структуру. Двойная связь $\text{C}=\text{O}$ карбонильной группы поляризована и в определенном смысле может быть представлена как одинарная связь с разделением зарядов:



причем отрицательный заряд локализуется на атоме кислорода.

Изучение кристаллических структур соединений, содержащих амидную связь, показало, что расстояние $\text{C}-\text{O}$ в них примерно на 10% больше свойственного карбонильной группе в альдегидах и кетонах. Напротив, связь $\text{C}-\text{N}$ за счет смещения свободной электронной пары азота к углероду приобретает в определенной мере характер двойной и укорочена опять-таки примерно на 10%. По Л.Полингу, электронная структура пептидной связи передается двумя резонансными структурами:



причем на долю структуры II с двойной связью углерод—азот в гибриде приходится около 40%. В результате азот пептидной связи практически полностью утрачивает основность. То обстоятельство, что связь C—N в пептидной группировке имеет характер частично двойной, приводит к важным стереохимическим последствиям: вращение вокруг нее сильно ограничено, она задает плоскость, в которой располагаются шесть атомов: O и C карбонильной группы, атомы азота и водорода группы NH и C_α-атомы обоих аминокислотных остатков.

Плоскостная геометрия пептидной группировки и затрудненность поворота вокруг C—N-связи делают возможным существование достаточно устойчивых *цис*- и *транс*-изомеров, разделенных значительным энергетическим барьером (около 20 ккал/моль¹), что делает превращение одного изомера в другой редким событием. Они отличаются тем, что C_α-атомы главной цепи размещаются по одну (*цис*) или по разные (*транс*) стороны пептидной связи C—N (рис. 5.1):

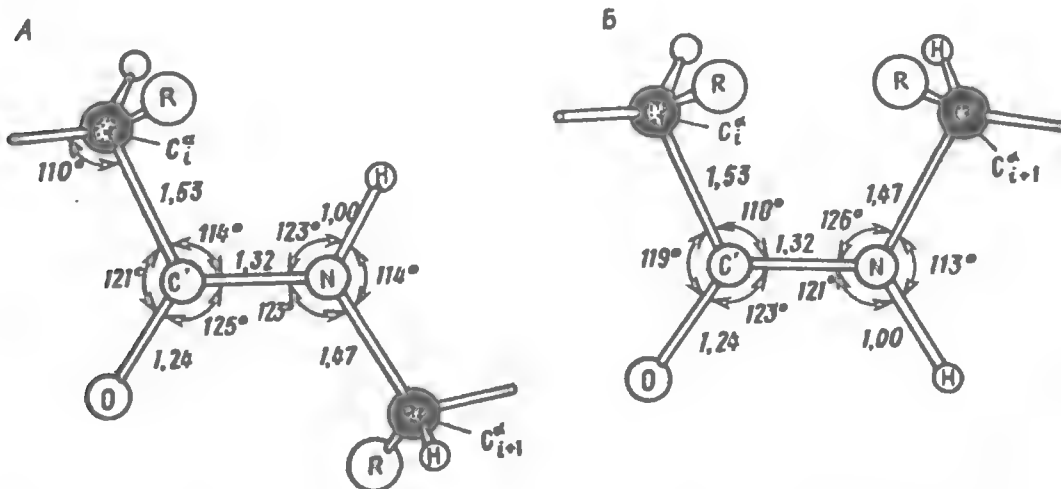
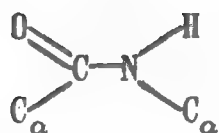


Рис. 5.1. Структура пептидной связи. А — *транс* — типичная, Б — *цис* — редко встречающаяся конфигурация пептидной связи

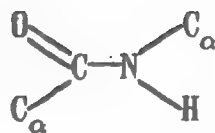
Атомы C_i^α, C_{i+1}^α, C и O карбонильной группы, N и связанный с ним H лежат в одной плоскости. Указаны межатомные расстояния в ангстремах и валентные углы. О конфигурации судят по ходу главной цепи

¹ 1 ккал = 4,184 кДж.



Цис

Пептидная связь



Транс

Транс-изомер пептидной связи энергетически выгоднее *цис*-изомера примерно на 2,6 ккал/моль, так как сближение C_{α} -атомов в последнем вызывает пространственные затруднения. Эта разница между изомерами в значительной мере снимается, составляя 0,5 ккал/моль, если азот пептидной связи принадлежит пролину, поскольку в таком случае в обоих изомерах в *цис*-положении к C_{α} -атому ацилирующего аминокислотного остатка оказываются C_{α} - или C_{β} -атомы пролина. Рентгеноструктурный анализ подтвердил, что пептидные связи в белках являются плоскими и представлены почти исключительно *транс*-изомерами. *Цис*-пептидные связи редки: их встречается, как правило, не более одной-двух на белок среднего размера, причем преобладают связи, образованные остатками пролина. Среди 32,5 тыс. пептидных связей в большой выборке изученных пространственных структур только 116 (0,36%) имели *цис*-конфигурацию, однако среди 1,5 тыс. связей Хаа—Pro¹ *цис*-изомеров оказалось 6,5%. В качестве примера укажем *цис*-пептидные связи, образованные остатками Pro-93 и Pro-114 в панкреатической рибонуклеазе, Pro-168 в субтилине и связь Ser-197 — Tyr-198 в карбоксипептидазе А.

Таким образом, пространственное строение полипептидной цепи может быть представлено как последовательность плоских элементов — пептидных группировок, соединяющихся между собой через C_{α} -атомы, которые служат своего рода шарнирами. Вращение плоских пептидных группировок может происходить вокруг двух простых связей, которые соединяют атом азота с C_{α} -атомом ($N - C_{\alpha}$) и C_{α} -атом с углеродом карбонильной группы ($C_{\alpha} - C(=O)$). Жестких запретов для вращения вокруг этих связей нет, однако есть некоторые предпочтительные конформации.

¹ Хаа — обозначение любой аминокислоты.

5.2. СТЕРИЧЕСКИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ И ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА ПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ

Углы вращения вокруг связей $N-C_\alpha$ и $C_\alpha-C(=O)$ называют соответственно углами φ и ψ (рис. 5.2). Для отсчета этих двугранных углов прибегают к следующему приему. Если представить, что наблюдатель смотрит вдоль связи $N-C_\alpha$, то "следующая" связь $C_\alpha-C(=O)$ может оказаться заслоненной "предшествующей" связью $C(=O)-N$. Такой конформации (заслоненной или *цисоидной*, очевидно, невыгодной стерически) соответствует угол $\varphi = 0^\circ$. Если связь $C_\alpha-C(=O)$ не заслонена и для достижения заслоненной конфигурации связь $C(=O)-N$ нужно вращать по часовой стрелке, угол φ считается положительным и возрастает до 180° . В последнем случае достигается *трансоидная конфигурация*. В противоположном направлении отсчитываются отрицательные значения угла φ от 0° до -180° . Аналогично, для определения угла ψ смотрят вдоль связи $C_\alpha-C(=O)$, при этом заслоненной конформации (когда связь $N-C_\alpha$ закрывает связь $C(=O)-N$) приписывается угол $\psi = 0^\circ$, а трансоидной — угол $+$ или -180° .

Значения углов φ и ψ для какого-либо аминокислотного остатка характеризуют его положение во вторичной структуре. Если указать эти значения для всей последовательности аминокислот, то ими определится свертывание данного полипептида в пространстве. Как отмечалось, принципиально возможны любые наборы значений двугранных углов φ и ψ , однако многие из них сопряжены со зна-

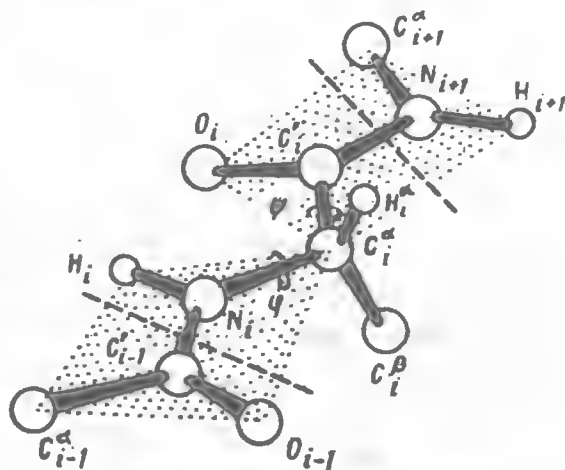


Рис. 5.2. Двугранные углы полипептидной цепи

Угол ψ определяется поворотом связи $N_i-C_\alpha^i$ вокруг связи $C_\alpha^i-C_\beta^i$, если смотреть по ходу пептидной цепи, т.е. от C_α^i к углероду карбонильной группы C_β^i , как показано стрелкой. Принято считать, что если первая связь закрывает связь $C_\beta^i-N_{i+1}$ (цисоидная конфигурация), то угол ψ равен 0° , если же эти связи находятся в наиболее удаленных положениях (трансоидная конфигурация), то угол ψ равен $+$ или -180° . Положительным считается вращение по часовой стрелке. Угол φ определяется поворотом связи C_{α}^{i-1} вокруг связи $N_i-C_\alpha^i$. Цисоидной конфигурации, при которой связи, примыкающие к $N_i-C_\alpha^i$, закрывают одна другую, соответствует $\varphi = 0^\circ$, трансоидной — $\varphi = \pm 180^\circ$. На рисунке изображена так называемая вытянутая конформация пептида, при которой углы φ и ψ равны $+180^\circ$.

чительными стерическими помехами и отвечают весьма невыгодным энергетическим конформациям.

Для описания стереохимии аминокислотных остатков в белках удобна карта Рамачандрана, представляющая собой квадрат, по одной стороне которого отложены значения угла φ от -180° до $+180^\circ$, а по другой — значения угла ψ (рис. 5.3, 5.4). Если бы не накладывалось никаких ограничений на стереохимию полипептидной цепи, то углы φ и ψ могли бы принимать любые значения и точка, характеризующая их набор, а значит, и конформацию того или иного аминокислотного остатка, могла бы оказаться в любом месте карты.

В действительности допустимы вовсе не любые комбинации углов φ и ψ . Это связано тем, что при изменении обоих углов изменяется и положение атомов в соседних аминокислотных остатках друг относительно друга. Сближение в пространстве атомов, особенно объемистых (кислорода, углерода, азота) приводит к их взаимному отталкиванию. Преодоление этого отталкивания требует значительных энергетических затрат, что делает такую конфигурацию полипептидной цепи неустойчивой. Карты Рамачандрана подобны географическим, на них нанесены горизонтали, соответствующие тому или иному энергетическому уровню. Более выгодной конформации соответствует меньший энергетический уровень, который на карте Рамачандрана выглядит как долина, впадина; наименее выгодной отвечает гребень, хребет.

Рассмотрим карту Рамачандрана для остатков глицина, не имеющих боковой группы (см. рис. 5.3). В этом случае разрешена довольно большая часть карты, возможен широкий набор углов φ и ψ . Однако случаи, когда эти углы близки к нулю, невыгодны: это отвечает заслоненной конфигурации, при которой особенно сказывается перекрывание атомов кислорода карбонильных групп. Конформационная карта Рамачандрана для глицина проста — она показывает крестообразную "запрещенную" возвышенность вдоль осей с $\varphi = 0^\circ$, $\psi = 0^\circ$ и довольно обширные понижения, охватывающие не менее половины общей поверхности.

Эта особенность глицина как остатка с наименьшими конформационными ограничениями играет специфическую роль в формировании пространственной структуры белка. Характерно, что на картах Рамачандрана для реальных белков точки, соответствующие остаткам глицина, не сгущаются в двух главных долинах, как это свойственно для других аминокислот, а распределяются почти по всему полю. Очевидно, что остатки глицина используются в тех точках пространственной структуры белка, где необходима нестандартная конформация, в частности при резких поворотах пептидной цепи. Не случайно, что остатки глицина, казалось бы, не способные из-за отсутствия боковой

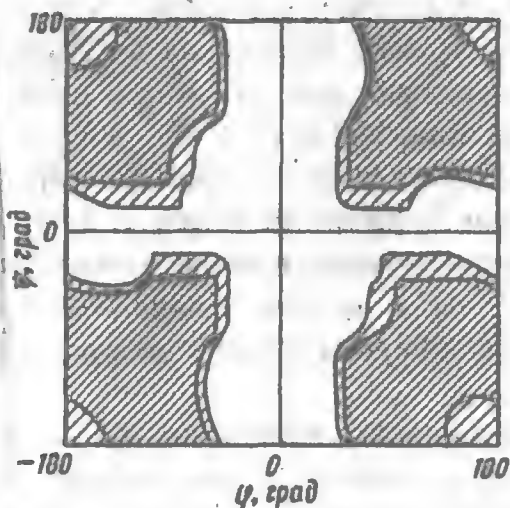


Рис. 5.3. Карта Рамачандрана для глицина

Отложена потенциальная энергия для пары пептидных звеньев с остатком глицина между ними (изоэнергетические линии). Для глицина неблагоприятны конформации, занимающие на этой карте крестообразную возвышенность вдоль значений φ и ψ , близких к 0° , что соответствует заслоненной конфигурации; обширные понижения (затенены) отвечают разрешенным областям. Ср. рис. 5.13, на котором показано, что остатки глицина в реальных белках позволяют прилегающим пептидным связям занимать друг относительно друга весьма различные конформации

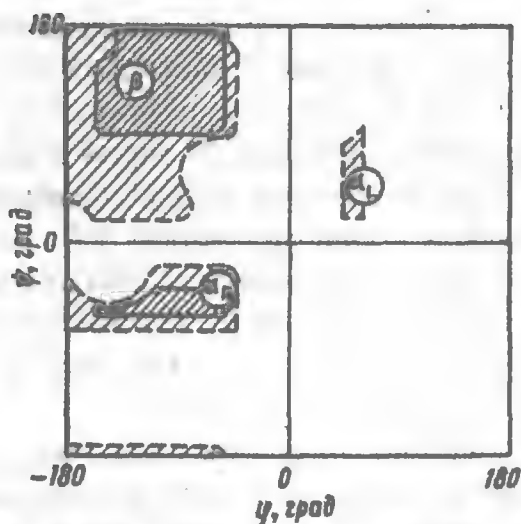


Рис. 5.4. Карта Рамачандрана для L-аланина

Показано распределение потенциальной энергии для остатка аланина, окруженного двумя пептидными звеньями в координатах φ и ψ (см. подпись к рис. 5.3). Глубокая долина в верхнем левом квадранте соответствует конформации, характерной для β -структуры; соединенная с ней перевалом долина в левом нижнем квадранте — правой α -спирали (α_R), обычно встречающейся в белках. Небольшое понижение в правом верхнем квадранте соответствует крайне редкой левой α -спирали (α_L). Следует обратить внимание, что карту можно свертывать относительно осей φ , $\psi = 0^\circ$, поэтому, например, долина, соответствующая β -структуре, продолжается у нижнего обреза карты слева

цепи непосредственно участвовать в функционировании белка, чаще других оказываются *инвариантными* в семействах эволюционно родственных белков, что указывает на их незаменимость в структурообразовании.

Очевидно, что набор разрешенных конформаций существенно уменьшится, если отойти от рассматривавшейся до сих пор упрощенной схемы и учесть стерическое влияние боковых цепей аминокислот. Было бы нелегко проанализировать вклад всех 19 боковых цепей, однако в этом нет необходимости. Наиболее значительные ограничения на конформационную свободу аминокислотных остатков накладывает появление простейшего заместителя у C_α -атома — метильной груп-

пы в остатке аланина. Дальнейшие усложнения боковой цепи происходят сравнительно далеко от главной цепи и мало влияют на выбор ее оптимальной конформации. Карта Рамачандрана для аланина в достаточном приближении верна и для других аминокислот.

На этой карте (рис. 5.4) выявляются две долины, отвечающие стабильным конформациям, т.е. оптимальным сочетаниям углов φ и ψ , и неглубокая впадина. Одна из долин соответствует правой α -спирали, характерной для белков ($\varphi = -57^\circ$, $\psi = -47^\circ$), другая — параллельной β -структуре ($\varphi = -119^\circ$, $\psi = +113^\circ$) и антипараллельной β -структуре ($\varphi = -139^\circ$, $\psi = +135^\circ$).

То, что для обычных аминокислот разрешены лишь две области, две долины на конформационной карте, а значит, и два набора (с известными допусками) углов φ и ψ , в какой-то мере предопределяет и ограниченность набора периодических вторичных структур. Так, присоединяя к аминокислотному остатку с набором $\varphi = -57^\circ$, $\psi = -47^\circ$ другой остаток с примерно такими же двугранными углами, затем третий и т.д., получим периодическую вторичную структуру — α -спираль. Точно так же, соединяя в цепь остатки с двумя другими разрешенными наборами углов, придем к двум известным типам β -структуры.

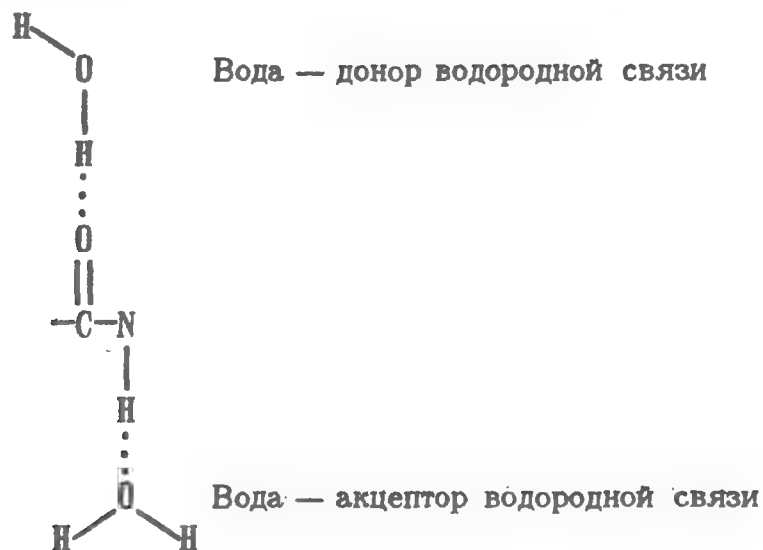
5.3. РОЛЬ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ В ФОРМИРОВАНИИ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

До сих пор, обсуждая вторичную структуру, мы рассматривали упрощенную модель поведения аминокислотного остатка в пептидной цепи, концентрируя внимание на *стерических ограничениях*, которые могут быть вызваны его ближайшими соседями. Следующий шаг, усложняющий картину и вместе с тем приближающий ее к реальности, — учет *нековалентных взаимодействий между близкими остатками* в периодической вторичной структуре. При этом мы по-прежнему абстрагируемся от вклада боковых групп и пренебрегаем дальними взаимодействиями с другими частями молекулы.

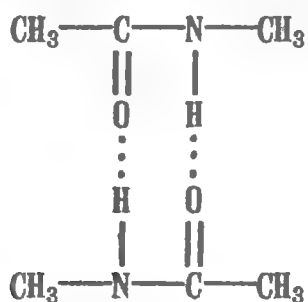
Главная цепь полипептида содержит только один периодически повторяющийся элемент, способный устанавливать водородные связи, — пептидную группировку, которая при этом может выступать и как донор, и как акцептор.

Насколько существенной может быть стабилизация вторичной структуры за счет водородной связи? Для ответа на этот вопрос следует учесть фактор, который до сих пор не рассматривался, — *влияние окружающей белок воды*. Вода способна эффективно конкурировать за

образование водородных связей, имея возможность быть и донором и акцептором:



Можно предвидеть, что влияние воды будет снижаться при формировании компактной пространственной структуры белка, росте содержания пептидных связей, повышении вероятности их взаимодействия друг с другом. Действительно, изучение простейшей модельной системы N-метилацетамида ($\text{CH}_3\text{—CO—NH—CH}_3$) показало, что при малых его концентрациях образование димеров, например



за счет возникновения межмолекулярных водородных связей практически не наблюдается. Лишь при очень высокой концентрации N-метилацетамида (до 10 М) он практически полностью димеризуется. В отсутствие же воды, например в тетрахлориде углерода, полная димеризация достигается уже при 0,2 М концентрации амида.

В белке реализуются оба эти эффекта — *пептидные связи сближены*, находясь в свернутой цепи, вероятность их встречи примерно такая же, как в 9М растворе N-метилацетамида. Разумеется, очень существенно и то, что сближение пептидных связей в белке происходит не случайным образом, как в концентрированном растворе амида, а в *кооперативной системе*. В то же время в компактной белковой глобуле *полярность окружения пептидной связи значительно меньше*,

чел в воде. Сложение этих двух факторов и делает водородную связь между пептидными группировками весьма важным структурообразующим фактором.

Таким образом, стабильность вторичной структуры существенным образом зависит от ее включения в компактную третичную структуру белка. Напротив, в пептидах из-за меньшего их размера вторичная структура не обеспечивает необходимой стабильности. Так, даже довольно длинный природный пептид — глюкагон, содержащий 29 аминокислотных остатков, — существует в растворе как равновесная смесь конформеров, и только при образовании комплекса с белком-рецептором, т.е. при включении в компактную структуру за счет нековалентных взаимодействий, он образует α -спираль.

5.4. α -СПИРАЛЬ

В 50-х годах Л.Полинг и Р.Кори, основываясь на данных о структуре кристаллов аминокислот и простых пептидов, рассмотрели возможные периодические конформации полипептидной цепи и пришли к выводу, что наиболее вероятна структура, названная ими α -спиралью. При этом в основу выбора именно этой вторичной структуры были положены следующие критерии:

1. Образование плотноупакованной компактной структуры без пустот и перекрывания атомов.

2. Максимальная насыщенность структуры водородными связями с тем условием, чтобы геометрия водородной связи $O \cdots H \cdots N$ была близка к линейной.

3. Соблюдение межатомных расстояний и углов, свойственных аминокислотам и простым пептидам.

С соблюдением этих условий можно построить как правую, так и левую α -спирали, однако правая α -спираль оказывается энергетически несколько выгоднее левой, если пептидная цепь образована L-аминокислотами.левой α -спирали отвечает на карте Рамачандрана небольшая впадина с углами $\varphi = +57^\circ$ и $\psi = +47^\circ$. Теоретические выводы Полинга и Кори в дальнейшем полностью оправдались. α -Спираль, действительно, представляет собой один из основных, хотя и не единственный тип вторичной структуры.

α -Спираль характеризуют следующие параметры. Теоретически предсказанные величины двугранных углов $\varphi = -58^\circ$, $\psi = -41^\circ$; средние значения, по данным рентгеноструктурного анализа 57 белков, $\varphi = -62^\circ$, $\psi = -41^\circ$. Ее радиус равен $2,3 \text{ \AA}^1$, высота подъема спирали,

¹ $1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ нм}$.

приходящаяся на один аминокислотный остаток, — 1,5 Å, среднее число остатков на один оборот — 3,6, шаг спирали (т.е. высота, на которую пептидная цепь поднимается за один оборот) — 5,4 Å. Все карбонильные группы в α -спирали ориентированы в одном направлении — вперед, если считать по ходу пептидной цепи, от аминного конца к карбоксильному, а N—H-группы — назад.

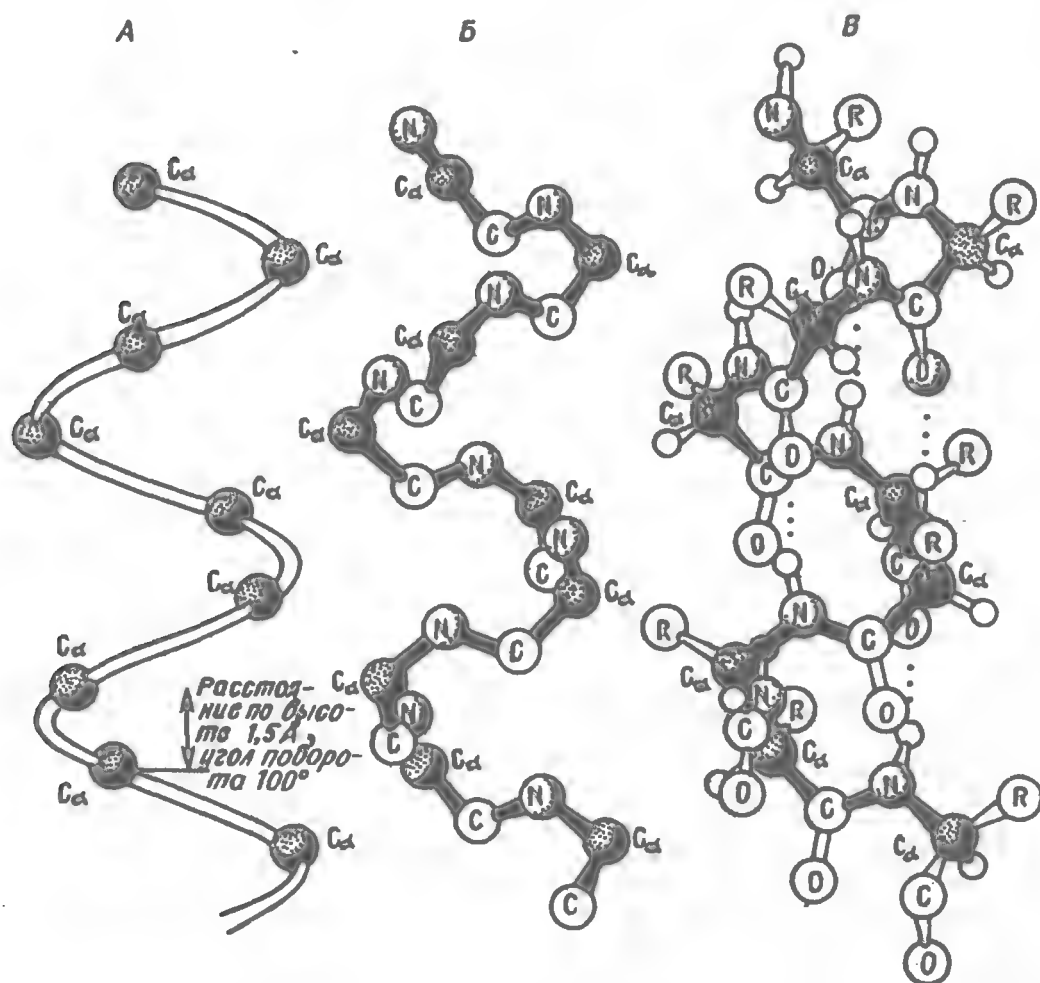


Рис. 5.5. Правая α -спираль. А — показаны только C_{α} -атомы; Б — все атомы скелета пептидной цепи; В — более полная структура

Пептидная цепь (от N- к С-концевому остатку) направлена сверху вниз. Водородные связи соединяют карбонильный кислород i -го остатка с водородом NH-группы $(i + 4)$ -го. В пространстве соседствуют боковые цепи аминокислот, разделенных двумя или тремя остатками. Размещение атомов в спирали кажется свободным только потому, что они для наглядности показаны в уменьшенном масштабе. С учетом реальных радиусов атомов α -спираль представляет собой плотно упакованную структуру, лишенную внутреннего канала и не проницаемую даже для воды. В проекции на ось спирали расстояние между соседними C_{α} атомами составляет 1,5 Å, угол поворота, приходящийся на один остаток, равен 100° . На полный поворот спирали (360°) приходится 3,6 остатка

Между C=O- и N-H-группами устанавливаются водородные связи (рис. 5.5.) так, что карбонильная группа i -го остатка образует связь с N-H-группой $(i + 4)$ -го, карбонильная группа $(i + 1)$ -го — с N-H-группой $(i + 5)$ -го и т.д. То, что "над" карбонильной группой i -го остатка оказывается NH-группа, а не карбонил $(i + 4)$ -го остатка, примерно и соответствует 3,6 остатка на оборот спирали.

Каждая пептидная группа поляризована и характеризуется определенным *дипольным моментом*, причем отрицательный заряд концентрируется на кислороде карбонильной группы, а положительный — на атоме азота. Из-за однонаправленности пептидных групп в α -спирали их дипольные моменты согласуются и α -спираль как целое приобретает дипольный момент, на ее концах концентрируются частичные отрицательный и положительный заряды, что может играть в белке существенную функциональную роль.

Возможности образования водородных связей между пептидными группами в α -спирали использованы сполна. В этом смысле α -спираль является как бы насыщенной, внутренне замкнутой. Она не способна (в отличие от β -структуры) к взаимодействию с другими элементами вторичной структуры за счет образования водородных связей между пептидными группами.

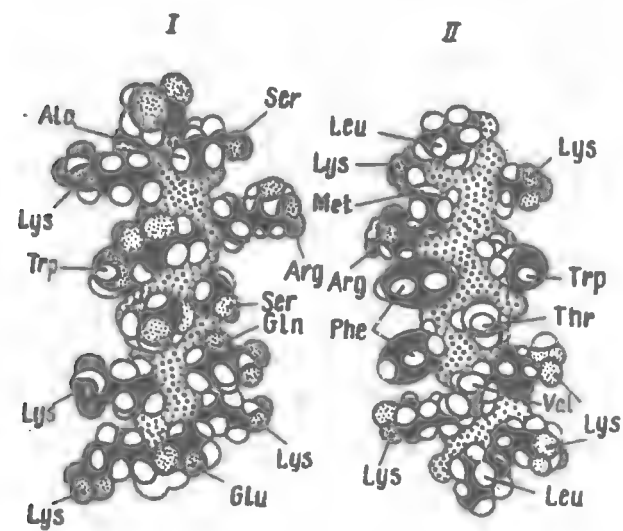


Рис. 5.6. Распределение гидрофильных и гидрофобных аминокислот на поверхности одной из α -спиралей аполипопротеина C-1:

I - гидрофильная поверхность, II - гидрофобная поверхность, на которой легко проследить гребень, который образуют (снизу вверх) боковые цепи лейцина, валина, двух остатков фенилаланина, метионина и снова лейцина

В формировании пространственной структуры белка важную роль играют *нековалентные контакты*, в которых участвуют боковые цепи аминокислот, входящих в α -спираль. При этом существенно, что на поверхности α -спирали оказываются сближенными боковые цепи аминокислот, разделенных двумя или тремя остатками в пептидной цепи. Если в этих позициях находятся гидрофобные аминокислоты, они образуют своеобразный *гидрофобный гребень*. Взаимодействие между такими гребнями используется как способ упаковки α -спиралей в пространственной структуре белка. Точно так же могут быть образованы и *гидрофиль-*

ные, в частности заряженные, поверхности. Поэтому α -спираль может быть *чисто гидрофобной*, что характерно для трансмембранных участков белков, или *амфифильной*, т.е. обладающей как гидрофобной, так и гидрофильной сторонами (рис. 5.6).

Длина α -спиральных участков в глобулярных белках относительно невелика и обычно составляет 5–15 аминокислотных остатков, редко превышая 3–4 оборота спирали; в фибриллярных белках она гораздо протяженнее. Иногда наблюдаются изломы α -спирали, обычно в местах включения остатков пролина, прерывающих систему водородных связей. При этом ось спирали отклоняется на 20–30°.

5.5. β СТРУКТУРА

Набор углов, отвечающий этой структуре, соответствует на карте Рамачандрана обширной глубокой впадине. В отличие от α -спирали β -структура стабилизируется взаимодействиями между соседними отрезками пептидной цепи, т.е. несколько более далекими контактами.

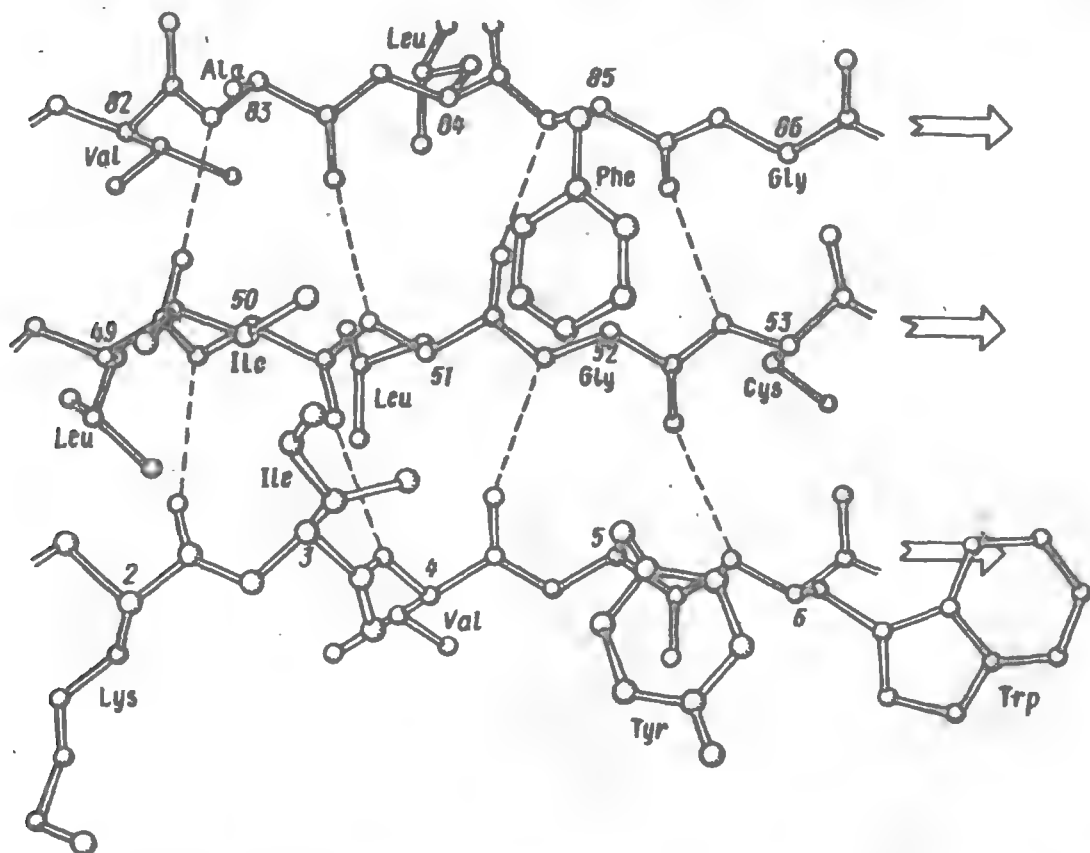


Рис. 5.7. Параллельная β -структура

Показана модель параллельного β -складчатого слоя в флаводоксине. Водородные связи (пунктирные линии) образуют 10-членные циклы. Стрелки указывают направление хода пептидных цепей

ми. Эти отрезки могут быть направлены в одну сторону — параллельная β -структура (угол $\varphi = -119^\circ$, $\psi = +113^\circ$) — или в противоположную — антипараллельная β -структура ($\varphi = -139^\circ$, $\psi = +135^\circ$).

Рассмотрим систему водородных связей между двумя отрезками пептидной цепи, образующими параллельную β -структуру. В этом случае (рис. 5.7) NH-группа какого-либо остатка в отрезке *A* дает водородную связь с карбонильной группой *i*-го остатка пептидной цепи *B*, а карбонильная группа того же аминокислотного остатка цепи *A* — с NH-группой (*i* + 2)-го остатка в параллельной цепи *B*. Важно, что (*i* + 1)-й остаток цепи *B* при этом как бы пропущен и его NH- и карбонильная группа во взаимодействии с цепью *A* не участвуют. Точно так же далеко не все C=O- и NH-группы цепи *A* участвуют во взаимодействии с цепью *B*.

Таким образом, два отрезка параллельной β -структуры соединяются водородными связями, что приводит к формированию больших циклов из 12 атомов. Еще раз подчеркнем, что в каждой из цепей во взаимодействии с соседней участвует только половина групп, которые могли бы образовать водородные связи. Следовательно, каждый из этих участков пептидной цепи может образовать такую же систему

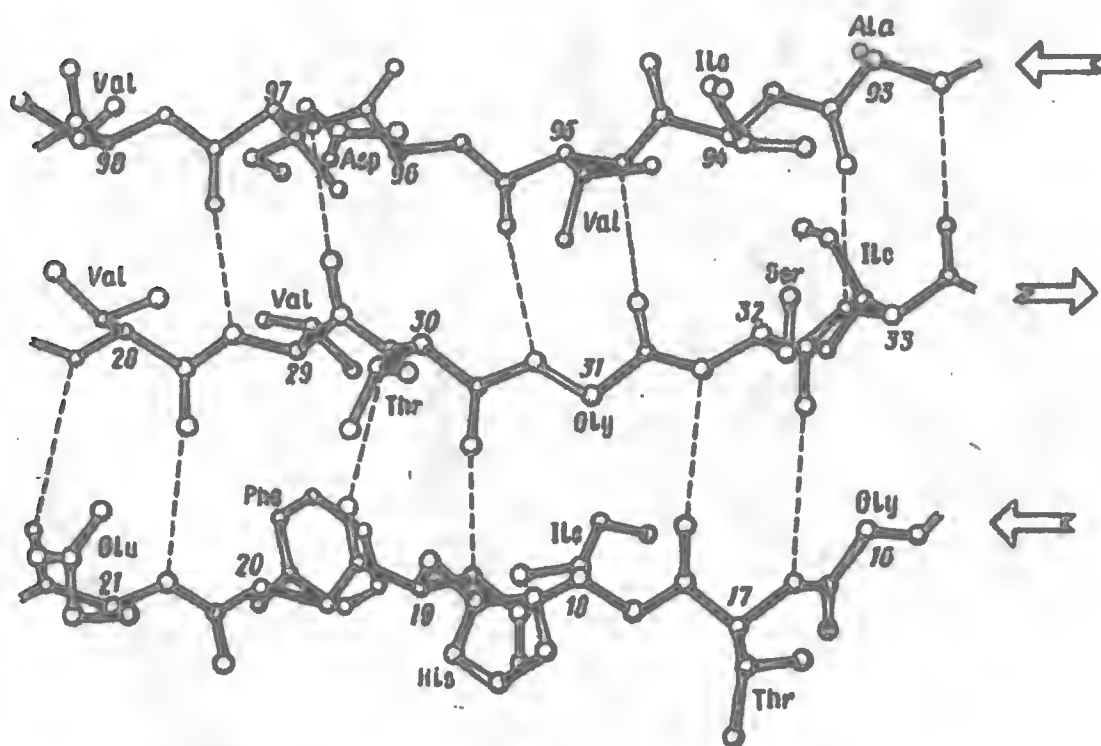


Рис. 5.8. Антипараллельная β -структура

Показан антипараллельный β -складчатый слой в супероксиддисмутазе. Водородные связи (пунктирные линии) образуют чередующиеся 8- и 14-членные циклы

водородных связей еще с одним отрезком, тот, в свою очередь, с другими и т.д. В отличие от α -спирали, насыщенной водородными связями и не способной поэтому взаимодействовать с другими участками белка на уровне вторичной структуры, каждый отрезок пептидной цепи в β -структуре открыт для формирования более протяженной системы водородных связей.

В антипараллельной β -структуре (рис. 5.8) водородные связи образуются между противоположно направленными пептидными группировками соседних отрезков, что приводит к чередованию 8- и 14-членных циклов. И в этом случае во взаимодействии с соседней пептидной цепью участвуют не все, а каждый второй аминокислотный остаток. Половина пептидных групп остается свободной, что дает возможность присоединить к каждому из двух антипараллельно направленных отрезков еще по одному отрезку пептидной цепи, и т.д. Таким образом, и антипараллельная β -структура не насыщена водородными связями и способна давать весьма протяженные образования, в которые включено несколько участков пептидной цепи.

Число аминокислотных остатков в отрезке пептидной цепи, образующем β -структуру, обычно колеблется от 3 до 8. Протяженная β -структура, так называемый β -слой, или β -складчатый лист (рис. 5.9), чаще всего состоит из 2—6 цепей, хотя иногда их число достигает и десяти.

Боковые группы аминокислотных остатков, соседних в пептидной цепи, при образовании β -структуры оказываются по разные стороны ее поверхности. Сама же поверхность имеет складчатую форму, причем складки заданы α -углеродными атомами остатков, находящихся в соседних цепях. Отходящие от α -углеродных атомов боковые группы образуют своего рода гребни. Это позволяет формировать довольно протяженные поверхности, насыщенные однотипными (например,

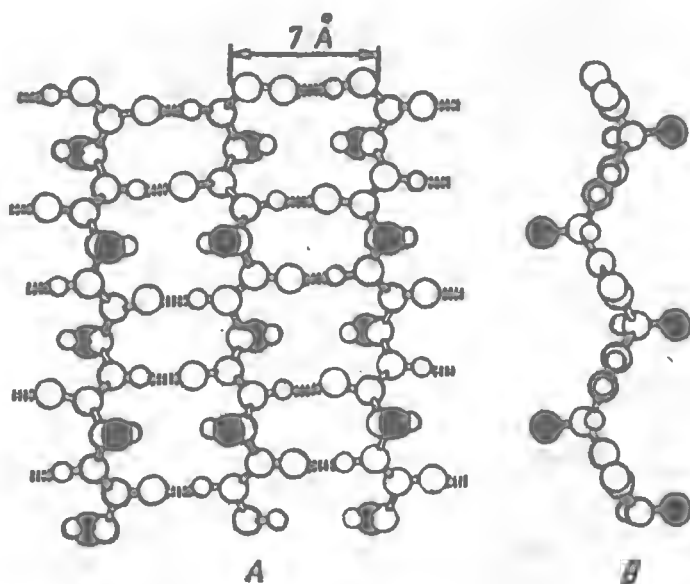


Рис. 5.9. β -Складчатый слой

А — антипараллельный β -складчатый слой; вид "сверху"; прерывистыми линиями обозначены водородные связи, зачернены β -атомы боковых групп; Б — вид "сбоку"; хорошо видны складчатость и размещение боковых групп по обе стороны слоя

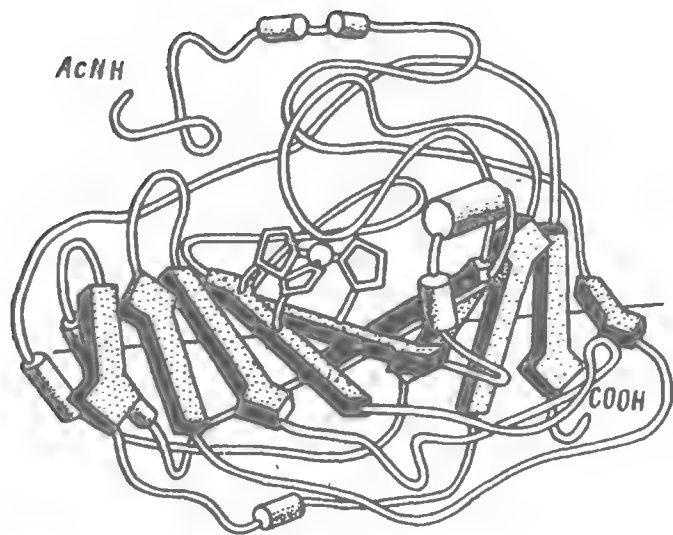


Рис. 5.10. Протяженный β -складчатый слой (в карбангидразе человека)

Десять отрезков β -структуры (преимущественно антипараллельной) закручены друг относительно друга, образуя супервторичную структуру, которая напоминает винтовую лестницу. Угол между первым и последним отрезками близок к 220° . Показаны ацетилированный аминный — AcNH- и карбоксильный — COOH-концы полипептидной цепи

гидрофобными) боковыми радикалами. Гидрофобные поверхности β -складчатого слоя, взаимодействуя между собой или с гидрофобными же гребнями α -спиралей, могут участвовать в построении внутримолекулярных гидрофобных ядер, стабилизирующих пространственную структуру белка.

Следует иметь в виду, что поверхность β -складчатого листа редко является плоской, чаще она закручена влево, если смотреть перпендикулярно ходу отрезков. Угол между соседними отрезками цепи составляет при этом около 25° . Многократное повторение такого мотива приводит к закручиванию листа в структуру, подобную винтовой лестнице. В результате угол между крайними отрезками пептидной цепи в β -листе колеблется от 0° в структуре конканавалина А до $70\text{--}80^\circ$ в дезоксирибонуклеазе I, 100° в нуклеотидсвязывающем домене дегидрогеназ и даже достигает 220° в карбангидразе (рис. 5.10).

Описаны также "барабаны", получающиеся при сворачивании протяженного β -листа, когда крайние отрезки пептидной цепи смыкаются, формируя между собой систему водородных связей, которая свойственна β -структуре. Очевидно, что β -структура в таких случаях утрачивает характер локального образования, подчас пронизывая всю белковую глобулу (и перерастает рамки данного в начале главы определения вторичной структуры). Учитывая это, к протяженным β -складчатым листам, играющим важную роль в формировании третичной структуры белка, применяют термин *супервторичная структура*.

На рис. 5.11 приведена схема NAD-связывающего домена глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, иллюстрирующая многообразие вторичных структур в этой молекуле.

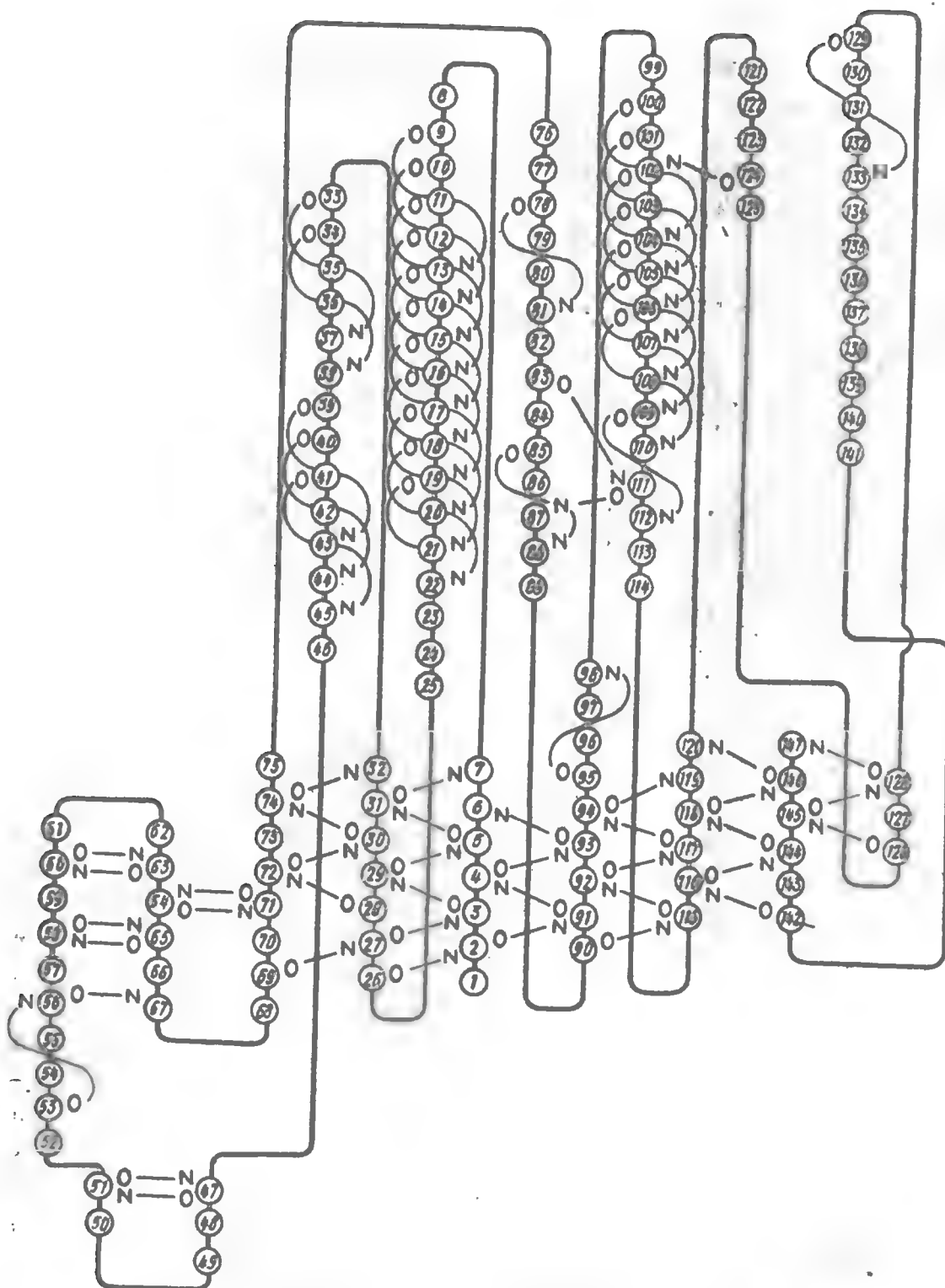


Рис. 5.11. Схема вторичных структур в NAD-связывающем домене глицеральдегидфосфатдегидрогеназы

Тонкими линиями показаны водородные связи в α -спиралях (например, от NH-группы остатка 19 к C=O остатка 15 и т.д.), участках параллельной (от NH и C=O остатка 3 к соответственно C=O остатка 27 и NH остатка 29) и антипараллельной β -структуры (отрезки 56-61 и 62-67). Есть и участки последовательности, например 134-141, которые не образуют системы водородных связей

5.6. β -ИЗГИБ

Как α -спираль, так и β -структура обычно представлены в глобулярных белках сравнительно короткими отрезками, поэтому значительная часть вторичной структуры белка приходится на разного рода петли, позволяющие изменить направление пептидной цепи. Наиболее экономный структурный элемент, позволяющий повернуть полипептид на 180° , используя всего три пептидные группировки, получил название β -изгиба (рис. 5.12). β -Изгиб стабилизируется одной водородной связью. Его образованию могут мешать объемистые боковые цепи аминокислот, поэтому предпочтительно включение в него остатка глицина. Заметим, что β -изгиб практически всегда оказывается на поверхности белковой глобулы, поэтому нередко он играет существенную роль в ее взаимодействии с другими молекулами, например с иммуноглобулинами.

Приведенная на рис. 5.13 карта Рамачандрана для реального белка, основанная на данных рентгеноструктурного анализа, показывает, что большинство аминокислотных остатков имеет конформацию, свойственную α -спирали или β -структуре. Лишь точки, соответствующие углам φ и ψ для остатков глицина, оказываются мало связанными конформационными ограничениями и распределены почти по всему полю карты.

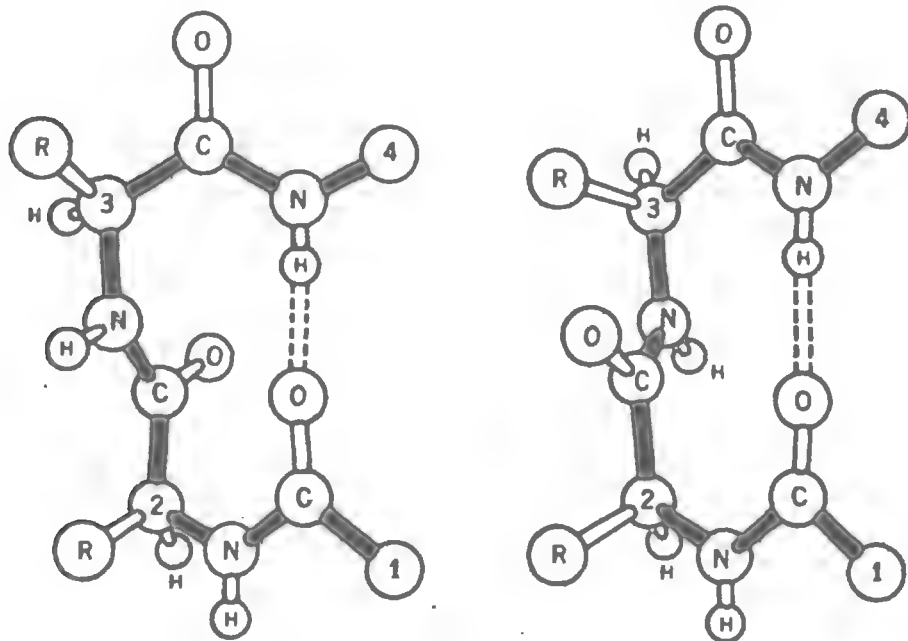


Рис. 5.12. β -Изгиб (две возможные структуры)

Поворот пептидной цепи на 180° происходит на отрезке, содержащем четыре аминокислотных остатка, причем между кислородом карбонильной группы 1-го остатка и водородом NH-группы 4-го образуется стабилизирующая изгиб водородная связь

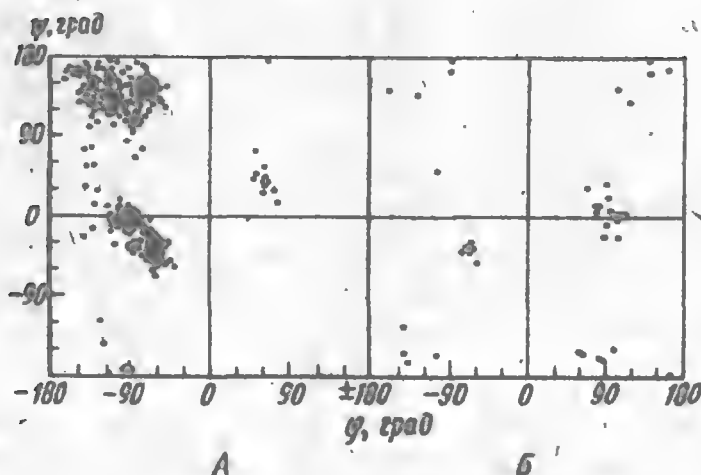


Рис. 5.13. Карта Рамачандрана для глутатионредуктазы:

А - точки, отвечающие конформации 419 аминокислотных остатков (исключая глицин), сгущаются в понижениях, долинах, которые соответствуют α -спирали (нижний левый квадрант) и β -структуре (верхний левый квадрант), встречаются и на перевале между ними. Небольшая группа остатков имеет конформацию, характерную для левой α -спирали ($\varphi = 60^\circ$, $\psi = 40^\circ$); Б - точки, отвечающие 41 остатку глицина, из которых 29 соответствуют наборам углов φ и ψ , не разрешенным для других аминокислотных остатков

Таблица 5.1. Относительное содержание в глобулярных белках аминокислотных остатков, принадлежащих различным типам вторичной структуры (по данным рентгеноструктурного анализа)

Белок	Содержание аминокислот, %			
	α -спираль	β -структура	β -изгиб	нерегулярные участки
Миоглобин	79	0	5	16
Парвальбумин	62	5	17	16
Аденлаткиназа	54	12	19	15
Инсулин	51	24	12	13
Лактатдегидрогеназа	45	24	6	25
Лизоцим	41	16	23	20
Цитохром с	39	0	24	37
Карбоксипептидаза А	37	15	26	22
Термоллизин	36	22	18	24
Субтилизин BPN	31	10	22	37
Ингибитор трипсина	28	33	3	36

Белок	Содержание аминокислот, %			
	α -спираль	β -структура	β -изгиб	нерегуляр- ные участки
Папаин	28	14	17	41
Нуклеаза	24	15	18	43
Рибонуклеаза А	23	40	13	24
α -Химотрипсин	9	34	34	23
Эластаза	7	52	26	15
Конканавалин	2	51	9	38

Относительное содержание вторичных структур различного типа в белках меняется в очень широких пределах (табл. 5.1), причем доля нерегулярных структур подчас оказывается весьма значительной

5.7. ОБ УСТОЙЧИВОСТИ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Оценивая факторы, которые определяют стабильность вторичной структуры, следует учитывать, что стерические ограничения, делающие благоприятными не любые, а только определённые наборы двугранных углов φ и ψ , отнюдь не запрещают иных сочетаний. В то же время система водородных связей, типичная для элементов вторичной структуры, в воде достаточно уязвима, поскольку и группы NH, и карбонильные группировки могут взаимодействовать не только между собой, но и с молекулами воды, что приводит к дестабилизации структуры. К тому же в глобулярных белках протяженность участков вторичной структуры ограничена, а кооперативность в рамках отдельного ее элемента невысока.

Таким образом, взятые сами по себе, в отдельности от компактной белковой глобулы, элементы вторичной структуры не должны обладать значительной стабильностью. Это подтверждает ряд экспериментов, в которых наблюдали за структурообразованием сравнительно коротких пептидов, воспроизводивших последовательность аминокислот в α -спиральных участках белка. Обнаружено, что такие пептиды, в частности фрагменты глобинов или спиральный участок миогемэритрина, в водных растворах содержат лишь флуктуирующие зародышевые α -спирали, причем равновесие, как правило, смещено в сторону

развернутых структур. Устойчивость α -спиралей заметно возрастает при понижении полярности среды путем добавления органических растворителей. Например, фрагмент 69—87 миогемэритрина, полностью спирализованный в белке, в смеси вода — трифторэтанол содержал около 50% α -спирали; причем спирализованной оказывалась преимущественно С-концевая половина пептида, тогда как в воде наблюдалось лишь временное образование отдельных оборотов пептидной цепи, быстро распадавшихся. Отмечалось также образование β -изгибов в водных растворах коротких пептидов.

Следовательно, элементы вторичной структуры приобретают устойчивость только после их объединения в компактную белковую глобулу, поскольку в последней резко повышается кооперативность системы нековалентных взаимодействий, а значительная часть структуры оказывается погруженной в среду с полярностью гораздо меньшей, чем у воды. Наконец, немаловажно, что в компактной структуре значительная часть внутримолекулярных водородных связей скрыта от воздействия воды и вероятность их разрыва гораздо меньше.

Итак, вторичная структура как устойчивое образование существует только в рамках компактной белковой глобулы. Однако флуктуирующие *мерцающие элементы вторичной структуры*, которые могут возникать уже на коротких участках пептидной цепи, очень важны как *предпосылка формирования пространственной структуры*, по-видимому, начинающегося со взаимодействия, "схлопывания" соседних α -спиралей, β -изгибов, а затем и элементов β -структуры. Такие ассоциаты, еще недостаточно стабильные, могут служить зародышами возникновения компактной структуры, *единицами ее свертывания*.

5.8. О СООТНОШЕНИИ МЕЖДУ ПЕРВИЧНОЙ И ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРАМИ

Как уже говорилось, при описании вторичной структуры пренебрегают боковыми радикалами аминокислот и ролью дальних взаимодействий. Однако по мере уточнения картины эти факторы необходимо учитывать: так, уже переход от глицина к аминокислоте с простейшей боковой цепью — аланину — резко сужает выбор возможных конформаций, еще резче уменьшается он для пептидных связей, включающих иминный азот пролина. Более тонкий учет влияния индивидуальных особенностей аминокислот выявляет некоторые предпочтения в образовании той или иной вторичной структуры.

Это обусловлено не только стереохимическим влиянием боковых цепей на стабильность конформации, но и тем, как они укладываются

на поверхности возникающей структуры, каков образующийся при этом рисунок. Например, если гидрофобные остатки распределены в первичной структуре так, что разделяются двумя-тремя остатками полярных аминокислот, то образуется своеобразный гребень из гидрофобных радикалов α -спирали, направленных по одну сторону. За счет взаимодействия таких гребней может начаться формирование пространственной структуры, которая, в свою очередь, стабилизирует вторичную. Таким образом, предпочтительное образование того или иного типа регулярной вторичной структуры может определяться не только природой аминокислотных остатков, но и характером их размещения на данном участке пептидной цепи.

Весьма полезным оказался статистический анализ установленных пространственных структур белка, который позволил приписать отдельным аминокислотным остаткам параметры, характеризующие их большую или меньшую склонность встраиваться в α -спираль, β -структуру или образовывать β -изгиб. Если просматривать вновь определенную первичную структуру, используя "окно", соответствующее нескольким идущим подряд остаткам, то удастся, например, выявить характерные скопления остатков, склонных встраиваться в α -спирали. Это позволяет предполагать, что в данном белке они свернуты в α -спираль. Такое предположение проверяется соответствием остатков, расположенных на концах спирали, аминокислотам, обычно занимающим такое положение. Дальнейшие уточнения дают соображения стереохимического характера.

Разработано несколько приемов *предсказания вторичной структуры белков по их первичной структуре*, из которых наибольшее распространение получили методы, предложенные П.Чоу и Дж.Фасманом, О.Птицыным и А.Финкельштейном, а также В.Лимом. Как показала проверка на ряде белков, вероятность предсказания α -спиральных участков достаточно велика, хуже предсказываются β -структурные элементы и изгибы.

Трудность однозначного предсказания вторичной структуры понятна, так как после образования какого-либо ее элемента он должен включиться в третичную структуру, т.е. войти в систему дальних взаимодействий. Последние могут стабилизировать вторичную структуру, но могут и нарушить ее. Ввиду этого всегда существует некоторая вероятность, что предсказание не оправдается. Действительно, анализ большого числа пространственных структур белков показал, что одни и те же короткие аминокислотные последовательности могут образовывать в разных белках одинаковые вторичные структуры, что установлено, например, для восьми гепта- и гексапептидных участков. Однако нередки и такие случаи, когда идентичные последовательно-

сти дают разные вторичные структуры в белках различного строения. Это найдено для семи гексапептидных отрезков. В частности, одна и та же последовательность



имеет в фосфофруктокиназе конформацию α -спирали, расположенной между двумя другими α -спиралями, тогда как в термолизине она входит в β -складчатый слой вместе с четырьмя другими фрагментами пептидной цепи.

Итак, дальнейшие взаимодействия в рамках третичной структуры могут вносить заметные коррективы в соотношение первичная структура — вторичная структура, делая его далеко не всегда однозначным. Важно, однако, что успешное предсказание ряда вторичных структур, в особенности α -спиральных участков, с определенностью указывает на то, что это соотношение реально существует. Предсказание вторичных структур помогает при сравнении белков, в частности в таких случаях, когда сопоставление первичных структур не выявляет значимого процента совпадающих аминокислотных остатков (например, их меньше 15%), однако есть основания заподозрить, что эти белки тем не менее родственны и обладают сходной пространственной структурой. В отсутствие прямых данных по укладке полипептидных цепей таких белков сходство предсказываемых элементов вторичной структуры может служить полезным аргументом. Нередко предсказание вторичной структуры позволяет выявить характерные особенности отдельных участков белка: например, гидрофобные α -спирали могут оказаться трансмембранными.

5.9. ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Наиболее надежным является определение вторичной структуры по результатам рентгеновского анализа пространственного строения белка. Однако этот метод сложен и требует значительного времени, существенно уступая в скорости современным способам установления первичной структуры, поэтому важно хотя бы примерно оценивать содержание отдельных типов вторичной структуры в белке. Кроме того, рентгеноструктурный анализ не позволяет следить за изменениями пространственной, а значит, и вторичной структуры белка в растворе в условиях, особенно интересных для изучения функции.

Для такого рода задач используют *оптические методы* — исследование *кругового дихроизма* или *дисперсии оптического вращения*. Оба эффекта основаны на электронных взаимодействиях между *хромофора-*

ли — карбонильными группами соседних пептидных связей. Такие взаимодействия существенно зависят от взаимной ориентации карбонильных групп в пространственной структуре, а значит, от конформации соответствующих участков полипептидной цепи белка.

Так, набору углов φ и ψ , свойственному тому или иному типу вторичной структуры белка, отвечает характерный спектр кругового дихроизма. В наблюдаемых спектрах реальных белков вклады отдельных типов вторичной структуры суммируются. Сопоставление спектров кругового дихроизма для ряда белков, имеющих, по данным рентгеноструктурного анализа, существенно разное содержание α -спиралей, β -структурных элементов, β -изгибов, участков с нерегулярной структурой, позволяет найти базисные спектры, свойственные этим видам вторичной структуры. Спектр кругового дихроизма изучаемого белка может быть представлен как сумма базисных спектров. Вклад каждого из них пропорционален содержанию соответствующего типа вторичной структуры в данном белке.

Такой способ обычно дает результаты, неплохо согласующиеся с данными рентгеноструктурного анализа. Как правило, легче предсказывается содержание α -спиралей, обладающих более выраженными особенностями спектра кругового дихроизма, несколько сложнее — содержание β -структурных элементов и β -изгибов. Однако главное достоинство метода — не в определении абсолютного содержания отдельных типов вторичной структуры. Он особенно ценен для наблюдения за тем, как изменения условий сказываются на вторичной, а значит, и на третичной структуре белка. Метод незаменим при исследовании денатурации белков, характеристике белковых фрагментов и фибриллярных белков.

ГЛАВА 6

ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА

Третичной структурой называют распределение в пространстве всех атомов белковой молекулы. При этом не учитывают взаимодействия этой глобулы с соседними глобулами или субъединицами. Часто понятие третичной структуры сужают, концентрируя внимание на наиболее устойчивом ее элементе — *свойственном данному белку способе укладки полипептидной цепи в пространстве*. Характерно, что для больших групп эволюционно родственных белков, подчас очень значительно отличающихся по первичной структуре и, значит, по распределению всех атомов в пространстве, способ укладки полипептидной цепи остается в главных чертах неизменным. Это показывает, что допускаемое

упрощение оправдано, так как оно отражает существенные черты третичной структуры.

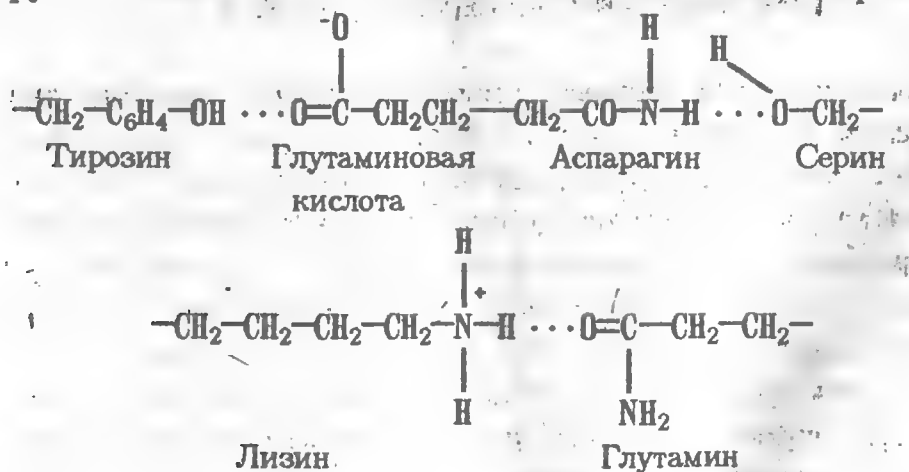
Известное сходство приведенного определения третичной структуры с понятием вторичной структуры лишь внешнее, поскольку вторичная структура характеризует относительно небольшой участок белка и определяется локальными нековалентными взаимодействиями, тогда как третичная структура зависит от *осей суммы взаимодействий — ковалентных и нековалентных* — в белковой глобуле.

Третичная структура — *основа функциональности белка*, которая требует точной пространственной организации больших ансамблей, построенных из множества аминокислотных остатков и их боковых групп. Такие ансамбли формируют активные центры ферментов, зоны связывания других биологических молекул, эффекторные центры белков и т.д., поэтому нарушение третичной структуры белка (денатурация) неизменно приводит к утрате им способности функционировать.

6.1. СТАБИЛЬНОСТЬ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА

Стабильность третичной структуры зависит от *системы нековалентных взаимодействий* внутри белковой глобулы. Некоторые белки дополнительно стабилизируются ковалентными — *дисульфидными* — связями; однако немало белков, в том числе достаточно стабильных, вовсе их лишены.

Среди нековалентных взаимодействий, реализующихся при образовании пространственной структуры белка, наибольшую точность в фиксировании межатомных расстояний и углов обеспечивают *водородные связи*. Им, как известно, принадлежит решающая роль в формировании вторичной структуры, в особенности периодических ее элементов: α -спиралей и β -структур. В дополнение к этому водородные связи соединяют между собой и с главной цепью множество функциональных групп боковых цепей аминокислотных остатков, например



Существенно, что внутри белковой глобулы реализуется не менее 90% возможных водородных связей.

Система водородных связей наряду с другими нековалентными взаимодействиями — *ван-дер-ваальсовыми* связями и *электростатическими контактами* — чрезвычайно важна для стабилизации компактной нативной белковой глобулы. Действительно, изменение свободной энергии и, значит, константа K равновесия пептидная цепь $\longleftrightarrow$ белковая глобула в первом приближении определяется уравнением

$$\Delta G_{\text{цепь}} = RT \ln K = \Delta H_{\text{цепь}} - T \Delta S_{\text{цепь}}.$$

(Подчеркнем, что ролью воды, окружающей белок, мы пока пренебрегаем, рассматривая белковую молекулу как бы находящейся в вакууме, на это и указывают индексы "цепь".)

В этом выражении величина $\Delta H_{\text{цепь}}$ отрицательна, что отражает вклад нековалентных взаимодействий, устанавливающихся внутри белковой глобулы. Для стабилизации глобулы эта величина должна компенсировать энтропийный член — $T \Delta S$, который положителен, так как свертывание неупорядоченного клубка — неструктурированной полипептидной цепи — в глобулу упорядочивает структуру и влечет за собой убыль энтропии пептидной цепи, а следовательно, ΔS отрицательна. Если такая компенсация достигнута, то K окажется равной единице и, значит, доли нативных и денатурированных молекул белка станут равными. Для того чтобы равновесие отчетливо сдвинулось в сторону образования компактной структуры, понадобится существенное превышение $\Delta H_{\text{цепь}}$ над $-T \Delta S$.

Соотношение же этих двух величин зависит прежде всего от числа нековалентных связей, устанавливающихся при свертывании полипептидной цепи в глобулу, а значит, от длины пептидной цепи. Этим объясняется обсуждавшаяся уже граница между пептидами и белками. В то же время видно, что с ростом температуры T член $T \Delta S$ рано или поздно превысит по абсолютной величине ΔH и пространственная структура утратит стабильность — произойдет тепловая денатурация белка.

Реальная картина, однако, существенно зависит от учета взаимодействия белка с растворителем, обычно с водой. Действительно, вода способна образовывать водородные связи как с пептидными группировками, так и с функциональными группами белка, конкурируя с формированием внутримолекулярных связей.

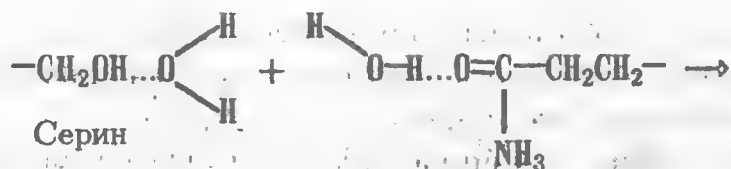
Если сравнить развернутое, денатурированное состояние белка со свернутым, нативным, то окажется, что при упаковке внутрь глобулы полярной группы:

1) последняя дает водородную связь с какой-либо другой полярной группой белка;

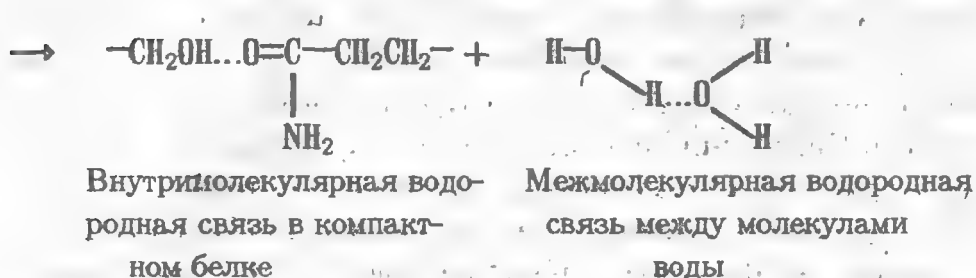
2) разрываются водородные связи, которые обе эти группы — донор и акцептор — в развернутой цепи имели с водой;

3) устанавливаются водородные связи "освободившихся" молекул воды с другими ее молекулами.

Рассмотрим, например, поведение двух полярных групп — гидроксил серина и амидной группы аспарагина, образующих внутримолекулярную водородную связь при свертывании цепи в компактную структуру:



Водородные связи с водой в развернутой цепи.



В целом никакого выигрыша в числе водородных связей при свертывании глобулы произойти не может, так как одновременно утрачиваются водородные связи цепь — вода. Важно, чтобы неизбежный проигрыш — снижение числа водородных связей в результате того, что при свертывании какие-то полярные группы, погрузившись в глобулу, не найдут партнера и не смогут образовывать водородной связи, — не оказался слишком значительным (этим-то и диктуется необходимость образовать максимально высокое их число внутри глобулы: как уже отмечалось, не менее 90%). Понятно, что столь высокая степень насыщения глобулы водородными связями не может быть реализована хаотически. Гораздо эффективнее в этом смысле регулярные элементы вторичной структуры.

При свертывании глобулы убывает энтропия пептидной цепи, но одновременно происходит возрастание энтропии растворителя — воды. Последнее играет решающую роль в стабилизации третичной структуры белка, что объясняется следующими соображениями.

Как известно, вода представляет собой весьма необычный, в высо-

кой мере структурированный растворитель. Каждая ее молекула способна участвовать в образовании четырех водородных связей с другими молекулами воды. В результате в воде сосуществуют, находятся в динамическом равновесии со свободными молекулами относительно протяженные квазикристаллические *льдоподобные* структуры. Полярные соединения, в том числе *полярные группы белка*, относительно легко включаются в такие структуры, устанавливая водородные связи с окружающей белок водой.

Сложнее обстоит дело при взаимодействии с водой *неполярных боковых цепей* белка. На модельных соединениях — простейших углеводородах — показано, что они могут в небольшой степени растворяться в воде. При этом их молекулы, не способные устанавливать водород-

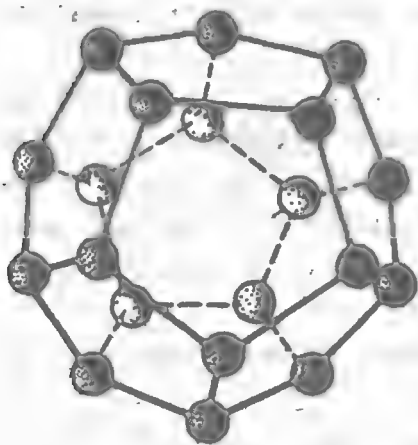


Рис. 6.1. Додекаэдр, образованный молекулами воды, соединенными водородными связями

Внутри додекаэдра образуется полость диаметром около 5 Å, в которой может быть размещено гидрофобное, т.е. не дающее водородных связей с водой, соединение. Формирование додекаэдра или аналогичных правильных структур с более крупными полостями требует упорядочения молекул воды, тем большего, чем больше поверхность размещенного в полости соединения. Это приводит к понижению энтропии системы и делает выгодным объединение гидрофобных элементов белка в ядро

Сложнее обстоит дело при взаимодействии с водой *неполярных боковых цепей* белка. На модельных соединениях — простейших углеводородах — показано, что они могут в небольшой степени растворяться в воде. При этом их молекулы, не способные устанавливать водородные связи, включаются в своеобразные "пустоты" в динамической структуре воды — полости, ячейки. Последние образованы молекулами воды, связанными между собой водородными связями (рис. 6.1).

По существу, это напоминает так называемые *соединения включения*. Возникновение таких ячеек означает упорядочение, выключение из хаотического движения значительного числа молекул воды, т.е. уменьшение энтропии растворителя — воды. Уменьшение энтропии, которое оказывается тем большим, чем больше поверхность раздела неполярные группировки — вода, ограничивает растворение углеводородов в воде: термодинамически выгодным оказывается расслоение системы, образование двух фаз — водной и углеводородной.

Нечто аналогичное сопровождает и растворение в воде пептидной цепи, несущей неполярные боковые группы. Каждая из таких групп оказывается в ячейке, окруженной структурированными молекулами воды, что приводит к уменьшению энтропии системы. "Отслаивание" углеводородных радикалов в этом случае, понятно, невозможно, — они нанизаны на скелет полипептидной цепи. Поэтому реализуется другой процесс — свертывание глобулы, при котором значительная часть (не менее

половины) гидрофобных боковых цепей оказывается скрытой от контакта с окружающей белок водой. При этом нередко наблюдается образование своеобразных внутримолекулярных "капель" из гидрофобных боковых цепей аминокислот, "гидрофобных ядер" более или менее сложной формы. Иногда такие ядра вытянуты, напоминая полумесяц, иногда распадаются на два-три самостоятельных небольших ядра.

Важно, что уменьшение поверхности соприкосновения гидрофобных групп с водой приводит к установлению между ними так называемых *гидрофобных контактов*. Заметим, что сближение неполярных групп влечет за собой установление ван-дер-ваальсовых контактов между ними, в определенной мере также стабилизирующих белковую глобулу. Однако вклад этих весьма слабых взаимодействий в энергетику процесса свертывания белка невелик, тогда как роль гидрофобных контактов, иными словами, роль изменения энтропии растворителя при свертывании белка *очень значительна*.

Термодинамика свертывания белковой глобулы характеризуется тем, что *факторы, способствующие образованию компактной нативной структуры, и факторы, действующие в противоположном направлении, почти сбалансированы*. Изменение свободной энергии при свертывании белка, содержащего примерно 100 аминокислотных остатков, составляет около 10 ккал/моль, или всего лишь 0,1 ккал в расчете на один аминокислотный остаток. Для сравнения укажем, что энергия водородной связи составляет около 3 ккал.

Еще важнее, что эта удивительно небольшая величина оказывается разностью двух достаточно крупных, но сбалансированных величин. Последнее приводит к тому, что белковая глобула может утрачивать стабильность, разворачиваться уже при относительно небольшом изменении указанных величин. Например, утрата только одной водородной связи при замене в лизоциме фага Т4 треонина изолейцином снижала температуру денатурации белка на 11°. Существенно, что дестабилизация третичной структуры белка может быть вызвана не только воздействием на белок, но и *изменением структуры растворителя — воды*.

Известно несколько способов оценки гидрофобности боковых цепей аминокислот, входящих в состав белка. Согласно одному из них, предложенному Р.Вольфенденем, определяют распределение соединений, моделирующих боковую цепь того или иного остатка между водой и находящимся в равновесии с ней паром. Так, боковая цепь треонина аппроксимировалась этиловым спиртом, радикал аланина — метаном и т.п. В этих условиях гидрофобные соединения будут стремиться покинуть воду и перейти в пар.

Оказалось, что по величине константы равновесия паровая

фаза/вода (т.е. по склонности перехода в пар) боковые цепи аминокислот могут быть собраны в следующие группы:

1. Константа порядка 10^2 — глицин, лейцин, изолейцин, валин, аланин.
2. Константа порядка 10^1 — фенилаланин, цистеин, метионин.
3. Константа порядка 10^{-4} — треонин, серин, триптофан, тирозин.
4. Константа порядка 10^{-8} — аспарагин, лизин, глутамин, глутамат, гистидин, аспартат.
5. Константа 10^{-14} — аргинин.

Первые две группы включают в себя *гидрофобные аминокислоты*, боковые цепи которых стремятся избежать контакта с водой. Помещение глицина в первую группу объясняется тем, что молекула водорода плохо моделирует атом водорода в глицине. В действительности при упаковке остатков глицина в белке особенно значителен вклад пептидной группировки $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-$, поэтому глицин трудно отнести к гидрофобным остаткам. Впрочем, известны случаи, когда в фиксированной третичной структуре белка метиленовая группа остатка глицина $-\text{CH}_2-$ выполняет роль гидрофобного звена.

Третья—пятая группы включают *гидрофильные аминокислотные остатки*. Для пролина в рамках данного подхода нельзя предложить модели. Анализ пространственных структур множества белков показывает, что указанное отнесение аминокислот к гидрофобным или гидрофильным в общем коррелирует с их распределением преимущественно внутри или на поверхности белковой глобулы (табл. 6.1, 6.2).

6.2. ГИДРОФОБНОЕ ЯДРО

Как правило, гидрофобное ядро состоит исключительно из *гидрофобных боковых цепей*, лишь изредка в него оказывается погруженным гидрофильный, тем более заряженный аминокислотный остаток. Принято считать, что такие исключения обусловлены какими-то функциональными требованиями.

В гидрофобное ядро, которое, как уже отмечалось, вовсе не обязательно приближается к сферической конфигурации, но более или менее компактно, обычно входит 20—30% общего числа аминокислотных остатков. В нем особенно представлены объемистые остатки лейцина, изолейцина, фенилаланина, валина. Так, ДНКазы I, полипептидная цепь которой состоит из 259 аминокислотных остатков, при формировании структуры образует три гидрофобных ядра, в которых содержится 70% имеющихся в этом белке гидрофобных остатков. Тенденцию к погружению гидрофобных боковых цепей (прежде всего аланина, валина, изолейцина, лейцина, фенилаланина и метионина)

внутри глобулы этого фермента, типичную и для других белков, иллюстрирует табл. 6.1.

Таблица 6.1. Доступность для воды боковых цепей аминокислотных остатков ДНКазы I

Аминокислота	Всего остатков	Недоступны для воды	Частично и полностью доступны	Процент доступных
Ala	22	13	9	41
Val	25	17	8	32
Ile	12	12	0	0
Leu	23	11	12	52
Phe	11	8	3	27
Met	4	3	1	25
Pro	9	2	7	78
Trp	3	0	3	100
Gly	9	3	6	67
Cys	4	1	3	75
Ser	31	4	27	87
Thr	14	3	11	79
Tyr	15	3	12	80
Asn	12	2	10	83
Gln	9	1	8	89
Asp	20	3	17	85
Glu	10	2	8	80
His	6	0	6	100
Lys	9	0	9	100
Arg	12	1	11	92

Общность тенденции к погружению гидрофобных боковых цепей внутрь глобулы подтверждает анализ пространственных структур 9 белков, которые содержат в общей сложности 2000 аминокислотных остатков, в том числе 587 (29%) скрытых, т.е. образующих гидрофобные ядра (табл. 6.2).

Упаковка боковых цепей аминокислот в гидрофобном ядре, как правило, близка к плотной (рис. 6.2), что делает эффективными ван-дер-ваальсовы взаимодействия между углеводородными структурами — дополнительный фактор стабилизации пространственной структуры. У эволюционно родственных белков с однотипной третичной структурой объем гидрофобного ядра обычно меняется мало — появление более крупных боковых групп компенсируется мутациями, которые приводят

Таблица 6.2. Доля аминокислотных остатков, которые после свертывания белка оказываются скрытыми, практически недоступными растворителю

Аминокислота	Процент скрытых остатков	
	от общего числа остатков данного типа	от суммы скрытых остатков
Ile	65	12
Val	56	15
Met	50	2
Cys	50	2
Phe	48	5
CySH	47	3
Leu	41	10
Ala	38	12
Gly	37	10
Thr	25	5,5
Ser	24	8
Pro	24	3
Trp	23	1,5
Glu	20	2
His	19	1
Asp	14,5	3
Tyr	13	2
Asn	10	2
Gln	6,3	2
Lys	4	0,1
Arg	0	0

к уменьшению объема находящихся с ними в контакте боковых радикалов. Все же было бы неправильным сводить стабилизирующее действие гидрофобного ядра только к его объему — *структурная организация имеет немалое значение.*

Примером может служить весьма тонкая зависимость стабильности белка гена V бактериофага f1 и его мутантов от природы аминокислот, образующих гидрофобное ядро. Так, замена изолейцина-47 на валин устраняет одну метильную группу из гидрофобного ядра, замена валина-35 на изолейцин, напротив, вводит дополнительную метильную группу. Следовательно, в двойном мутанте Ile-47 → Val; Val-35 → Ile объем гидрофобного ядра остается таким же, как и в белке дикого типа, хотя упаковка гидрофобных групп во внутреннем ядре белка,

естественно, должна несколько измениться. Оба мутанта, содержащие одиночные замены Ile-47 → Val и Val-35 → Ile, как и двойной мутант, о котором говорилось выше, похожи на исходный белок по строению и функции, однако значительно менее стабильны.

Гидрофобное ядро окружено наружной оболочкой, имеющей контакт с водой. В ней содержатся гидрофильные аминокислотные остатки, но наряду с ними немало и боковых цепей гидрофобных аминокислот — до половины их общего содержания. Нередко образуются своего рода гидрофобные пятна, "лоскуты", которые придают поверхности белка мозаичный характер, чередуясь со строго гидрофильными участками. Такие гидрофобные выходы могут иметь функциональное значение — они формируют гидрофобные участки зон связывания субстратов и других лигандов, участвуют в белок-белковых взаимодействиях, в частности в стабилизации четвертичной структуры.

Разумеется, границы между гидрофобным ядром и поверхностным слоем белка не так уж резки, более того, нередко обнаруживаются включенные в пространственную структуру молекулы воды, участвующие в поддержании системы внутримолекулярных водородных связей путем образования мостиков между функциональными группами боковых цепей аминокислот.



Рис. 6.2. Поперечное сечение (скол) модели лизоцима куриного яйца:

1 — отчетливо полярные группы, 2 — умеренно полярные, 3 — гидрофобные. Видно, что последние сконцентрированы внутри глобулы, но могут выходить на поверхность, в частности во впадине активного центра (слева сверху). Полярные остатки формируют оболочку, изредка (например, слева внизу) проникая внутрь глобулы

6.3. РОЛЬ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ В СТАБИЛИЗАЦИИ ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ

Дисульфидные связи образуются при окислении сближенных в пространственной структуре белка остатков цистеина в остатки цистина. Как уже упоминалось, это единственный тип ковалентных связей, участвующих в дополнение к обсужденным выше нековалентным взаимодействиям в стабилизации третичной структуры. Дисульфидные

связи встречаются далеко не во всяком белке, более того, известны весьма стабильные, в том числе термостабильные, белки, совсем лишенные их. Таким образом, наличие в белке дисульфидных связей вовсе не является непременным условием его стабильности, однако роль этих связей нельзя и недооценивать.

Вклад дисульфидной связи в конформационную стабильность белка существенно зависит от ее расположения в пространственной структуре. Полученные для ряда белков (панкреатической рибонуклеазы, лизоцима, легкой цепи иммуноглобулинов) оценки вклада дисульфидных связей в энергию стабилизации нативной пространственной структуры находятся в пределах 2,3 — 5 ккаль/моль. Значимость этих величин очевидна, если сравнить их с небольшой — порядка 10 ккал/моль — энергией стабилизации белковой глобулы. По-видимому, стабилизация белковой структуры дисульфидными связями объясняется прежде всего тем, что они, сохраняясь в денатурированном белке, резко сокращают число возможных конфигураций развернутой полипептидной цепи, понижая тем самым ее энтропию.

Как следствие, переход от такой развернутой цепи, содержащей дисульфидные связи, к нативной компактной структуре оказывается сопряженным с меньшей убылью конформационной энтропии и, следовательно, более выгодным, чем при отсутствии дисульфидных связей. Вероятно также, что сохранение в развернутой цепи ковалентных дисульфидных связей между участками, которым надлежит быть сближенными в нативной глобуле, облегчает поиск правильного пути образования пространственной структуры, благоприятно сказывается на кинетике ренатурации белковой молекулы.

Очевидно, что оба эти фактора, способствующие ренатурации белковой глобулы и препятствующие ее денатурации, могут действовать только после формирования пространственной структуры белка. Образование же дисульфидных связей в ходе биосинтеза не предшествует свертыванию полипептидной цепи в глобулу, а как бы сопутствует этому процессу, идет параллельно с ним.

При формировании белковой глобулы, вероятно, могут возникать промежуточные состояния, где некоторые дисульфидные связи "неправильны", т.е. образованы не теми остатками цистеина, между которыми они устанавливаются в нативной структуре белка. Лишь на конечной стадии может происходить их "корректировка".

Опыты по введению дополнительных дисульфидных связей в некоторые белки методами белковой инженерии показали, что далеко не всегда это приводит к повышению стабильности белка.

В большинстве случаев трудно судить с достаточной определенностью, почему для стабилизации некоторых белков используются ди-

сульфидные связи, тогда как другие белки вполне устойчивы только за счет нековалентных взаимодействий. По-видимому, дисульфидные связи важны для "кинетической" стабилизации (устойчивости к внешним факторам) секреторных белков, функционирующих вне более или менее постоянной внутриклеточной среды. Ясно, что дисульфидные связи, часто множественные, особенно важны для стабилизации маленьких белков, в которых не может возникнуть обширной системы нековалентных взаимодействий. Таковы, например, многие ингибиторы протеиназ, в частности панкреатический ингибитор трипсина. Его пептидная цепь, состоящая всего из 54 аминокислотных остатков, так хорошо стабилизирована четырьмя дисульфидными связями, что этот белок, несмотря на малые размеры, сохраняет компактную грушевидную форму при нагревании до 95 °С.

Впрочем, эти соображения не могут рассматриваться как сколько-нибудь жесткие правила, так как нетрудно указать секреторные, а также небольшие белки, не имеющие дисульфидных связей и тем не менее вполне стабильные.

6.4. ФОРМА, КОМПАКТНОСТЬ И ДИНАМИКА МОЛЕКУЛЫ БЕЛКА

Геометрическая форма глобулярных белков в первом приближении может быть аппроксимирована *эллипсоидом вращения*, у которого отношение полуосей, как правило, не превышает 2:1. В то же время поверхность глобулярных белков никак нельзя считать гладкой: она как бы изрыта, содержит впадины, а иногда весьма глубокие щели. Такая изрытость существенна для функционирования белка. Например, сорбция субстрата в достаточно хорошо сформированной щели в глобуле фермента переводит реакцию с его участием в совершенно новую среду. Как следствие, субстрат изолируется от воды, дегидратируются его функциональные группы, процесс протекает в среде с диэлектрической постоянной около 4—5, тогда как диэлектрическая постоянная воды составляет 80.

Внутреннее гидрофобное ядро белков нередко описывали как "жирную каплю", уподобляя ее структуру гидрофобному ядру мицеллы мыла или другого поверхностно-активного вещества. Хотя такое сравнение неплохо отражает физическую сущность сил, диктующих погружение гидрофобных элементов белка внутрь его глобулы, оно неточно. Боковые цепи гидрофобных аминокислот, образующие внутреннее ядро, не свободны, а достаточно плотно упакованы, приближаясь скорее к кристаллу, чем к жидкой капле. Это особенно справедли-

во для ядра, но свойственно и пространственной структуре белка в целом.

Анализ белковых кристаллов показывает, что плотность упаковки атомов в белковой глобуле, т.е. отношение суммы ван-дер-ваальсовых объемов аминокислотных остатков к объему глобулы, лежит в пределах 0,72—0,77, что вполне сравнимо с типичным диапазоном плотности упаковки в кристаллах органических соединений, 0,68—0,80 и выше интервала 0,60—0,65, характерного для органических жидкостей.

Все же и представление о белковой глобуле как о квазикристаллическом образовании также не вполне точно, поскольку для пространственной структуры белка, включая и плотноупакованные ее участки, характерна определенная *динамика*. Система водородных и других нековалентных связей в белке допускает *локальные флуктуации*, например частичное и обратимое "растегивание" α -спиралей или β -структур. Очевидно, этим объясняется и большая подвижность аминокислотных остатков, расположенных на концах упорядоченных элементов вторичной структуры, по сравнению с "внутренними" остатками, перемещение которых потребовало бы серьезных нарушений кооперативной системы нековалентных взаимодействий. В сочетании с наличием небольших пустот все это позволяет молекулам малого размера, например воде, перемещаться внутри пространственной структуры, несмотря на отмеченную плотность ее упаковки. Это делает возможным, в частности, обмен атомов водорода скрытых внутри глобулы "внутренних" пептидных связей с окружающей белок водой. Известны и функционально важные миграции молекул внутри белка.

Понятно, что аминокислотные остатки, расположенные на *поверхности* белка, еще более динамичны. Это особенно справедливо для длинных и, как правило, хорошо гидратированных боковых цепей лизина. Они нередко оказываются "невидимыми" при рентгеноструктурном анализе, так как образующие их метиленовые группы по мере удаления от α -углеродного атома описывают окружности все большего радиуса. Вследствие этого их электронная плотность оказывается как бы "размазанной", распределенной в довольно большом объеме. При рентгеноструктурном анализе миоглобина боковая цепь остатка Lys-98, направленная в раствор, прослеживается только до β -углеродного атома, тогда как в Lys-77, аминокетильная группа которого фиксирована солевой связью с остатком Glu-18, отчетливо выявляются все атомы углерода и азота. Нередко значительной подвижностью (до 10 Å) обладают петли нерегулярной структуры на поверхности белка. В целом поверхностный слой белка характеризуется значительно большей подвижностью, чем внутреннее ядро.

В то же время многие элементы структуры белков, содержащие

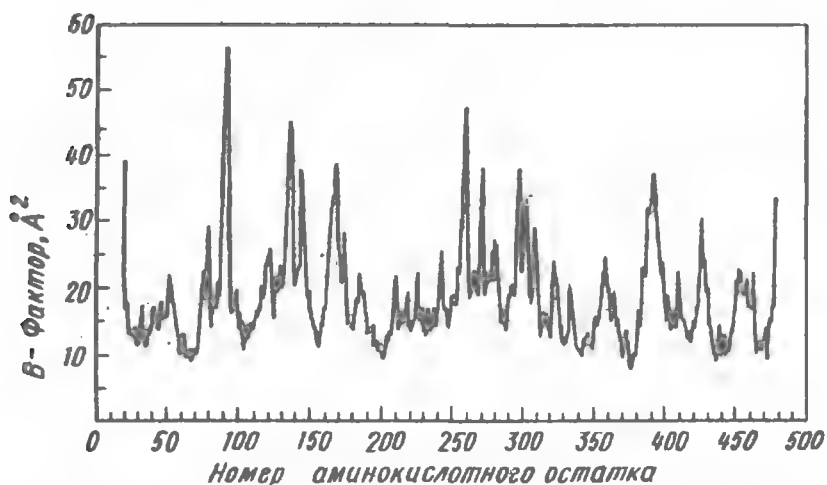


Рис. 6.3. Динамика пептидного скелета в глутатионредуктазе

В-Фактор характеризует (в первом приближении) подвижность аминокислотных остатков (их номера нанесены на оси абсцисс). Первые 17 аминокислот вообще не фиксированы. Пики соответствуют участкам с высокой подвижностью, минимумы — остаткам, вовлеченным в каталитический механизм и потому менее подвижным, в частности Glu-47, Cys-58, Cys-63, Lys-66, Tyr-197, Glu-201, Val-370, His-467

компоненты каталитического центра или иные функционально важные остатки, нередко оказываются менее подвижными, чем наружные петли. Этим, видимо, обеспечивается точность их взаимодействия с субстратами и другими лигандами, что, конечно, не отрицает возможности перемещений с небольшой амплитудой (рис. 6.3).

Разумеется, известны и гораздо более значительные изменения пространственной структуры белка, индуцируемые теми или иными факторами конформационные перестройки, которым принадлежит немалая роль в функционировании белковых молекул. Однако следует учитывать и описанную выше "микроскопическую" динамику пространственной структуры белка. Так, проникновение молекулы кислорода к месту его связывания гемом в миоглобине не могло бы произойти за разумные времена, поскольку доступ к этой точке белка закрыт боковыми цепями аминокислот. Лишь их флуктуации позволяют кислороду проникать внутрь миоглобина и выходить наружу, видимо, за счет механизма, близкого к диффузионному (см. гл. 8). Более того, атомные флуктуации могут выполнять роль своего рода "смазки" при перемещениях крупных участков структуры, препятствуя их "залипанию", а также помогать "причаливанию", взаимной подгонке поверхностей белковых глобул при образовании ими четвертичной структуры, формировании комплексов ферментов с субстратами и ингибиторами.

В табл. 6.3 обобщены данные о динамике, свойственной молекуле белка.

Таблица 6.3. Основные типы движений в белковой молекуле

Тип движения	Амплитуда, Å	Время, с
Атомные флуктуации (несогласованные перемещения отдельных атомов, например повороты на 20 - 60° вокруг простых связей пептидного скелета и боковых групп)	0,01 - 1	10^{-15} - 10^{-11}
Коллективные (согласованные) перемещения групп атомов (от нескольких до сотен)	0,01 - 5	10^{-12} - 10^{-3}
Индукцированные внешними факторами (например, связыванием субстрата) изменения конформации	0,5 - 10	10^{-9} - 10^3

Заметим, что источником первых двух типов движений могут быть *тепловые колебания*, тогда как движения третьего типа — крупные перестройки, — как правило, происходят за счет энергии взаимодействия белка с *теми или иными лигандами*. Необходимо подчеркнуть, что динамика структуры белка не только отражает физические особенности его организации, но и играет большую роль в его функционировании.

Для изучения динамических возможностей, заложенных в молекулах белка и их отдельных участках, прибегают к *методу молекулярно-динамического моделирования*. Используя распределение атомов в пространстве, полученное методом рентгеноструктурного анализа, приписывают атомам небольшие значения скоростей, распределенные случайным образом, и рассчитывают положение атомов и скорости, которые они приобретут через очень короткий интервал времени — порядка 10^{-15} с. При этом учитывают взаимодействия каждого атома с его соседями, используя мощные ЭВМ. Далее переходят к следующему интервалу времени и т.д. Затем изменяют набор скоростей, как бы переходя к более высокой температуре, тогда как начальное распределение скоростей выбиралось близким тому, которое отвечало бы абсолютному нулю. Постепенное приближение к распределению скоростей, свойственному температуре его реального функционирования, позволяет судить о динамических возможностях структуры в целом и его отдельных фрагментов за времена порядка 10^{-10} с.

6.5. ОСОБЕННОСТИ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА КАК ГЛАВНОГО ИСТОЧНИКА ИНФОРМАЦИИ О ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЕ БЕЛКА

Рентгеноструктурный анализ кристаллов белков является доминирующим методом определения их пространственной структуры. В последнее время развивается также изучение пространственного строения белков в растворах методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР), однако эти исследования, значение которых нельзя переоценить, пока ограничиваются сравнительно небольшими белками.

Не вдаваясь в обсуждение техники рентгеноструктурного анализа, кратко рассмотрим возможные его *ограничения*. Поскольку с помощью рентгеноструктурного анализа изучают строение белковой молекулы в кристалле, важнейший вопрос состоит в том, *насколько точно состояние этой молекулы в кристалле отражает ее строение, а значит, и поведение в растворе*, которое существенно для ее биологической роли. Казалось бы, взаимодействия между белковыми глобулами, обязательно возникающие при кристаллизации, способны сильно исказить строение белка, что существенно уменьшило бы ценность метода. Однако, как показали многочисленные наблюдения, этого не происходит.

Такое заключение подтверждается, во-первых, тем, что данные о пространственной структуре белков в растворе, полученные методом ЯМР, согласуются с результатами рентгеноструктурного анализа. Во-вторых, в кристаллах некоторых ферментов удалось наблюдать каталитическую активность, что указывает на сохранение в кристалле конформации, присущей нативному белку. Более того, пропитывание кристаллов раствором субстрата (а чаще — его аналога), ставшее стандартным приемом кристаллографии белков, приводит к его связыванию в активном центре. Это опять-таки указывает на сохранение нативной структуры в кристалле. В-третьих, для белков, в кристаллах которых содержатся по-разному ориентированные молекулы, последнее, несмотря на различие в контактах с "соседями", имеют практически идентичные пространственные структуры, если пренебречь некоторыми, обычно небольшими, отличиями в положении функциональных групп на поверхности контакта.

Заметим, что изменение конформации или отбор одной из нескольких конформаций при кристаллизации небольших органических соединений — события не столь уж необычные. *Сохранение же конформации при кристаллизации белков обусловлено особенностями строения белковых кристаллов*. Последние обязательно содержат большой объем воды, буферных солей — растворителя, из которого велась кристалли-

зация. Доля растворителя в белковых кристаллах достигает 50 % и более к общему объему. Поэтому белковая молекула в кристалле, хотя и имеет целый ряд нековалентных контактов с соседними, остается как бы погруженной в ту же среду, где она находилась до кристаллизации. В частности, удастся выявить слой из нескольких сотен молекул воды, непосредственно связанных с поверхностью белка и составляющих его гидратную оболочку. Таким образом, в силу своеобразия белковых кристаллов их образование не вызывает значительных структурных изменений в белке и метод рентгеноструктурного анализа дает, как правило, картину, правильно отражающую строение белковой молекулы в растворе.

Следует, однако, указать на весьма существенное ограничение, связанное с тем, что динамика белковой структуры в кристалле ограничена контактами с соседними молекулами. Это особенно верно для крупных структурных перестроек, поэтому необходимо иметь в виду известную тенденцию приуменьшать динамические возможности белка, базируясь на результатах рентгеноструктурных исследований.

6.6. ДОМЕНЫ В БЕЛКАХ

Свойственный белкам способ организации пространственной структуры — формирование гидрофобного ядра и мозаичной поверхности, содержащей как гидрофильные, так и гидрофобные элементы, — на первый взгляд, ограничивает размеры глобулы, поскольку с увеличением ее объема строго гидрофобное ядро будет составлять все меньшую долю. В какой-то мере это так, но ограничение затрагивает лишь размеры данным способом организованной структуры, а не молекулы в целом. Действительно, начиная примерно с молекулярной массы 14 — 16 кДа прослеживается тенденция к формированию белковой молекулы из двух (и более) в той или иной степени независимо образованных глобул, каждая из которых имеет свое гидрофобное ядро. Такие глобулы — *домены* — формируются различными отрезками одной и той же полипептидной цепи.

Доменами в белках называют области в третичной структуре, которым свойственна определенная автономия структурной организации. Автономия эта подчас столь значительна, что домены могут независимо от других частей белковой молекулы поддерживать и даже формировать пространственную структуру. Во многих случаях удастся разделить домены, подвергнув белок ограниченному протеолизу.

В рамках биологической функции данного белка домены нередко, хотя и не всегда, выполняют собственные задачи, и тогда структурная автономия домена дополняется *функциональной*. Например, нуклеотид-

связывающий домен дегидрогеназ, имеющий независимо от конкретной функции того или иного фермента одинаковый способ укладки полипептидной цепи, ответствен за взаимодействие с одним из субстратов реакции — коферментом NAD или NADP. Аминоконцевые домены (кринглы) ферментов системы свертывания крови обеспечивают связывание с липидами мембраны и другими белками (рис. 6.4), аминоконцевые домены иммуноглобулинов формируют центр связывания антигена.

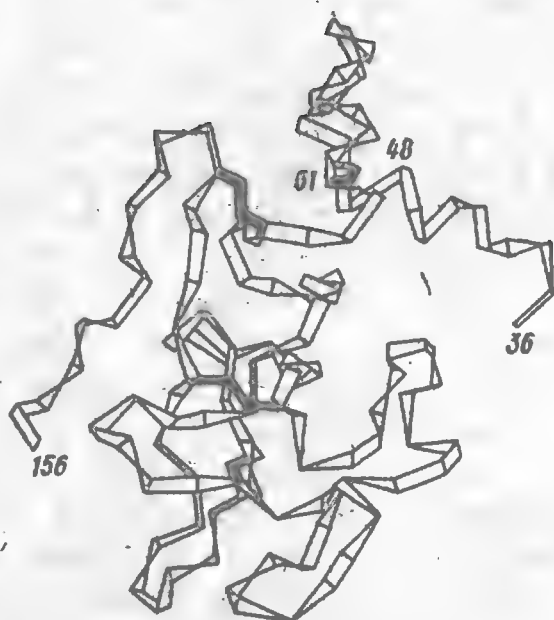


Рис. 6.4. Третичная структура одного из доменов протромбина

Однако в ряде случаев для доменов нельзя указать отдельной функциональной роли. Например, в структуре протеолитического фермента папаина хорошо различимы два домена, каждый из которых имеет гидрофобное ядро. В N-концевом домене оно содержит два остатка валина, два — изолейцина, один — лейцина, в С-концевом — два остатка валина, два лейцина, пять — изолейцина, два — фенилаланина. Между доменами, соединенными непрерывной пептидной цепью, устанавливается ряд гидрофобных контактов. Во впадине, разделяющей домены, расположен каталитический центр, причем образующие его функциональные группы размещены в обоих доменах. Быть может, на ранних этапах эволюции папаина домены и имели какую-то функциональную автономию, но в современном ферменте она полностью утрачена (рис. 6.5).

При активации этот домен — первый "крингл" (остатки 66–144) — обеспечивает связывание протромбина с фосфолипидом. Изломы "ленты" соответствуют α -углеродным атомам аминокислотных остатков; зачернены дисульфидные связи. По-видимому, такова же третичная структура других "кринглов" — функционально специализированных доменов в ферментах системы гемостаза (в тромбине их два, в плазминогене — пять)

Чаще всего домены формируются автономным свертыванием последовательно расположенных участков полипептидной цепи, хотя известны случаи, когда пространственная структура домена образована двумя далеко отстоящими друг от друга отрезками первичной структуры белка.

Наличие доменов, видимо, создает структурные предпосылки для большей, чем в рамках единой пространственной структуры, внутренней гибкости, динамики белковых молекул, достигаемой

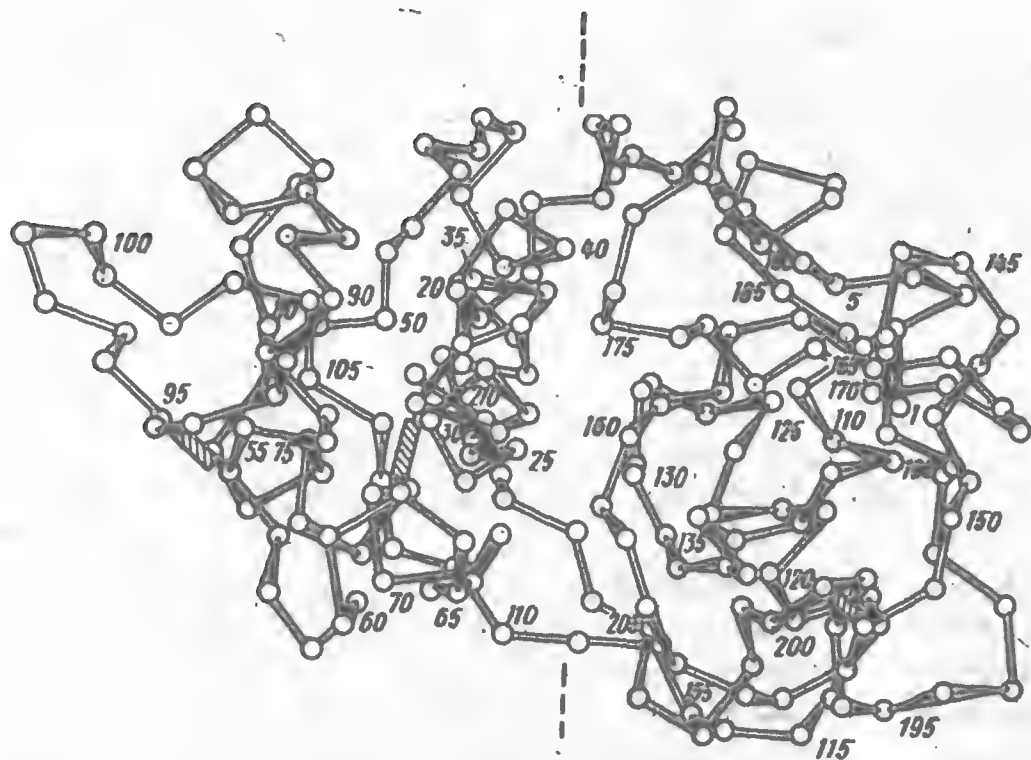


Рис. 6.5. Домены в структуре протеолитического фермента папайи - папайна

Прерывистыми линиями намечено направление впадины между двумя доменами, в которой связывается субстрат и размещен каталитический центр. Пептидная цепь завершает построение N-концевого домена к 110-му остатку и начинает формирование С-концевого со 111-го. Взаимодействие между доменами усиливается тем, что участок 1-16 N-концевого домена контактирует с С-концевым доменом, а С-концевой фрагмент последнего (остатки 208-212) - с N-концевым доменом. В каталитический центр входят остаток Cys-25 (в N-концевом домене), His-159 и Asn-175 (оба - в С-концевом домене). Заштрихованными прямоугольниками обозначены дисульфидные связи

смещением доменов относительно друг друга. Зоны, прилегающие к междоменному контакту, представляют собой в первом приближении впадину, опоясывающую белок. Это облегчает размещение участков специфического связывания белком различных лигандов, дегидратацию последних.

Предполагают, что домены соответствуют раннему этапу эволюции пространственной структуры многих белков, образовавшихся из глобул существенно меньшего размера. Например, необычно маленькая протеиназа вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), пептидная цепь которой состоит всего лишь из 99 аминокислотных остатков, по способу свертывания похожа на домены пепсина — протеиназы, действующей по сходному механизму. Поскольку протеиназа ВИЧ активна только как димер, можно думать, что она эволюционно родственна

какому-то древнему предшественнику доменов пепсина. Интересно, что границы доменов часто соответствуют границам экзонов. Это опять-таки позволяет предполагать, что они могли выступать как своеобразные блоки в процессе эволюции белков.

Домены составляют подуровень структурной организации белка на пути от вторичной к третичной структуре, и свертывание достаточно крупных белковых глобул при биосинтезе белка проходит, вероятно, через стадию формирования доменов.

6.7. ОБРАЗОВАНИЕ ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА ИЗ ЭЛЕМЕНТОВ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Укладка элементов вторичной структуры: α -спиралей, β -структурных отрезков, β -изгибов — в третичной структуре подчиняется, по-видимому, определенным правилам.

Упаковка α -спиралей. Для поверхности α -спиралей характерно образование гребней, разделенных впадинами — "канавками". Чаще всего такой гребень образуется боковыми радикалами аминокислот, которые разделены тремя аминокислотными остатками — боковая цепь i -го остатка оказывается в контакте с боковой цепью $(i + 4)$ -го остатка, последняя — с боковой цепью $(i + 8)$ -го остатка и т.д. Реже встречаются гребни, образованные i -, $(i + 3)$ -, $(i + 6)$ -м остатками. Вхождение гребня во впадину соседней α -спирали требует, чтобы угол между осями спиралей был близок соответственно 50° для гребня типа $i + 4$ или 20° для типа $i + 3$. Это обеспечивает достаточно плотный контакт между боковыми цепями, наблюдаемый в реальных белках. Расстояние между осями контактирующих α -спиралей составляет 6,8 — 12 Å в зависимости от длины боковых цепей (в среднем 9 Å); среднее "захождение" боковых цепей друг за друга в контакте 2,3 Å. Таким образом, при упаковке α -спиралей в пространственной структуре непосредственно взаимодействуют только концы боковых цепей аминокислотных остатков.

Упаковка α -спиралей и β -структуры. β -Слои в белках часто закручены. Боковые группы аминокислот, входящих в такую структуру, образуют гребни — i -й остаток взаимодействует с $(i + 2)$ -м, тот с $(i + 4)$ -м и т.д. Во впадину между двумя такими гребнями может укладываться любой из описанных выше гребней α -спирали. Именно так сформировано около 90% реально наблюдаемых контактов α -спираль — β -структура, причем направления их осей параллельны.

Упаковка β -листов. Известны два типа взаимодействия β -листов. Один из них состоит в укладке одного листа поверх другого с поворо-

том на -30° , другой (так называемая ортогональная упаковка) сводится к тому, что, по существу, непрерывный β -слой перегибается и складывается сам на себя, причем угол между его отрезками приближается к 90° . Иногда такой способ укладки описывают как барабан или цилиндр. Поверхности β -складчатых листов, обеспечивающие контакт с другими элементами вторичной структуры, на 60—70% образованы гидрофобными боковыми цепями валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, аланина. Видимо, разветвленные цепи особенно подходят для организации гидрофобных контактов.

6.8. ТОПОЛОГИЯ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ В БЕЛКАХ И КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУР

Выше были рассмотрены различные способы установления нековалентных контактов между элементами вторичной структуры. Существуют правила, которым подчиняется укладка периодических элементов вторичной структуры в пространственной структуре белков.

1. Элементы вторичной структуры, образованные соседними участками пептидной цепи, обычно соседствуют и в пространственной структуре. Типичны следующие соединения элементов вторичной структуры: $\alpha\alpha$ — две антипараллельно упакованные α -спирали; $\beta\beta$ — два антипараллельных отрезка β -структуры; $\beta\alpha\beta$ — α -спираль, окруженная двумя отрезками β -структуры. Такие структуры — единицы свертывания — являются, по существу, первым шагом от вторичной к третичной структуре, на их долю приходится до $2/3$ белковой глобулы.

2. Соединения между отрезками периодической вторичной структуры в единицах свертывания типа $\beta\alpha\beta$, где α — α -спираль или отрезок β -структуры, почти неизменно являются "правыми", т.е. направлены по часовой стрелке, если смотреть по ходу пептидной цепи.

3. Эти соединения не пересекаются и не образуют узлов пептидной цепи.

Физические основы этих правил не вполне ясны. Возможно, сближение в пространственной структуре соседних элементов пептидной цепи объясняется энтропийными факторами.

При всем многообразии пространственных структур белков удается выделить относительно небольшое число типов укладки полипептидной цепи, причем к одному типу могут принадлежать белки, вовсе не имеющие эволюционного родства. Очевидно, что ограниченность набора типов пространственной структуры диктуется существованием опре-

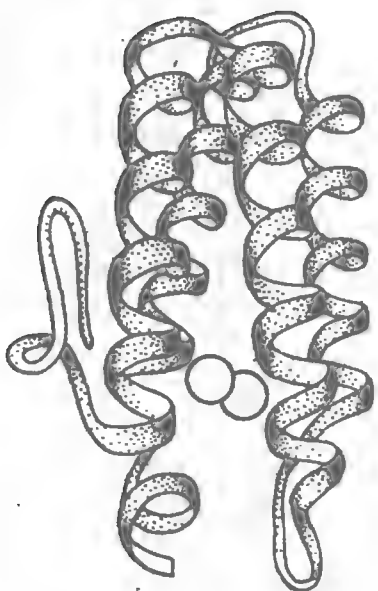


Рис. 6.6. Третичная структура миогемэритрина — белка, представляющего собой пучок четырех α -спиралей

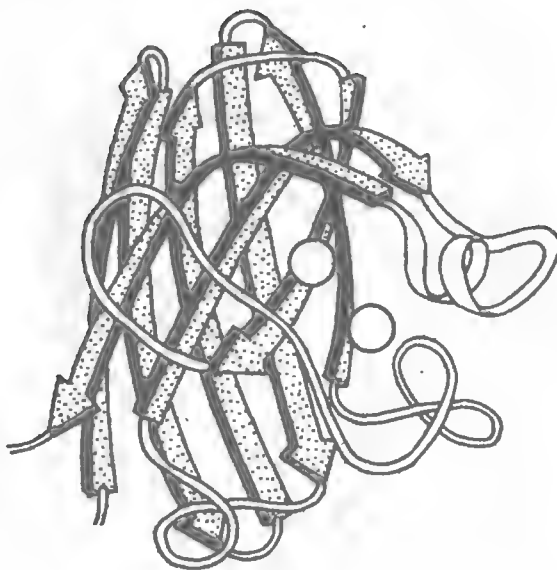


Рис. 6.7. Третичная структура супероксиддисмутазы — β -структурного белка

Восемь отрезков β -структуры соединены поворотами или петлями, есть небольшой участок α -спирали. Кругами показано расположение ионов металлов

деленных правил, которые управляют свертыванием полипептидной цепи в компактную глобулу.

Выделены следующие главные типы пространственной структуры:

1. α -Спиральные белки, построенные преимущественно из α -спиралей. Простейший структурный мотив в таких белках — пучок четырех α -спиралей, оси которых более или менее параллельны. Именно такую структуру имеют миогемэритрин (рис. 6.6), Н-субъединица ферритина. Типично α -спиральными белками являются глобины.

2. β -Белки, образованные преимущественно β -складчатыми слоями. В большинстве таких белков β -слои наложены под небольшим углом или ортогональны. Примерами таких белков могут служить пепсин и другие аспартильные протеиназы, супероксиддисмутаза (рис. 6.7), большое семейство белков-переносчиков метаболитов (например, жирных кислот).

3. α/β -Белки, в которых α -спирали и отрезки β -структуры чередуются. Обычно это приводит к формированию центрального β -складчатого листа, окруженного с обеих сторон α -спиралями, экранирующими его от воды. Этот тип пространственной структуры очень распространен. К нему принадлежат NAD-связывающие домены дегидрогеназ, триозофосфатизомераза (рис. 6.8) и около десятка других белков, структурно близких к этому ферменту.

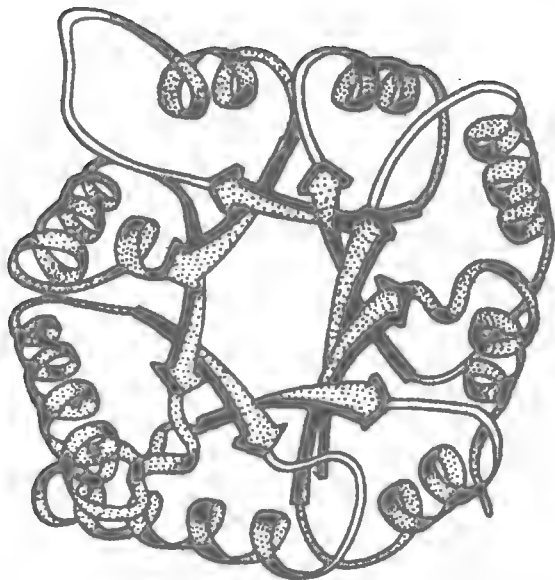


Рис. 6.8. Третичная структура триозофосфатизомеразы — типичного α/β -белка

Характерно чередование восьми отрезков β -структуры и восьми α -спиралей, экранящих β -слой от воды

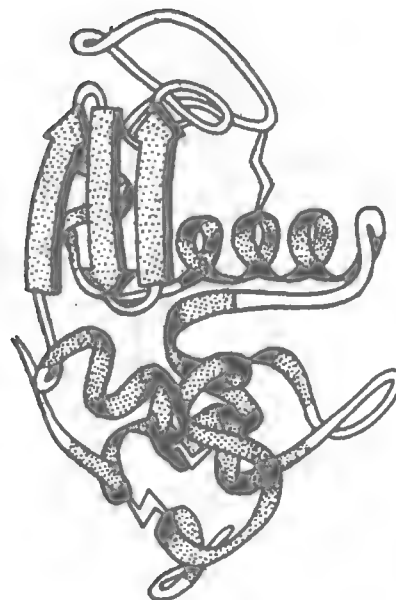


Рис. 6.9. Третичная структура лизоцима — $\alpha + \beta$ -белка

α -Спиральный и β -структурный домены (последний — в левой верхней части рисунка) отчетливо разделены

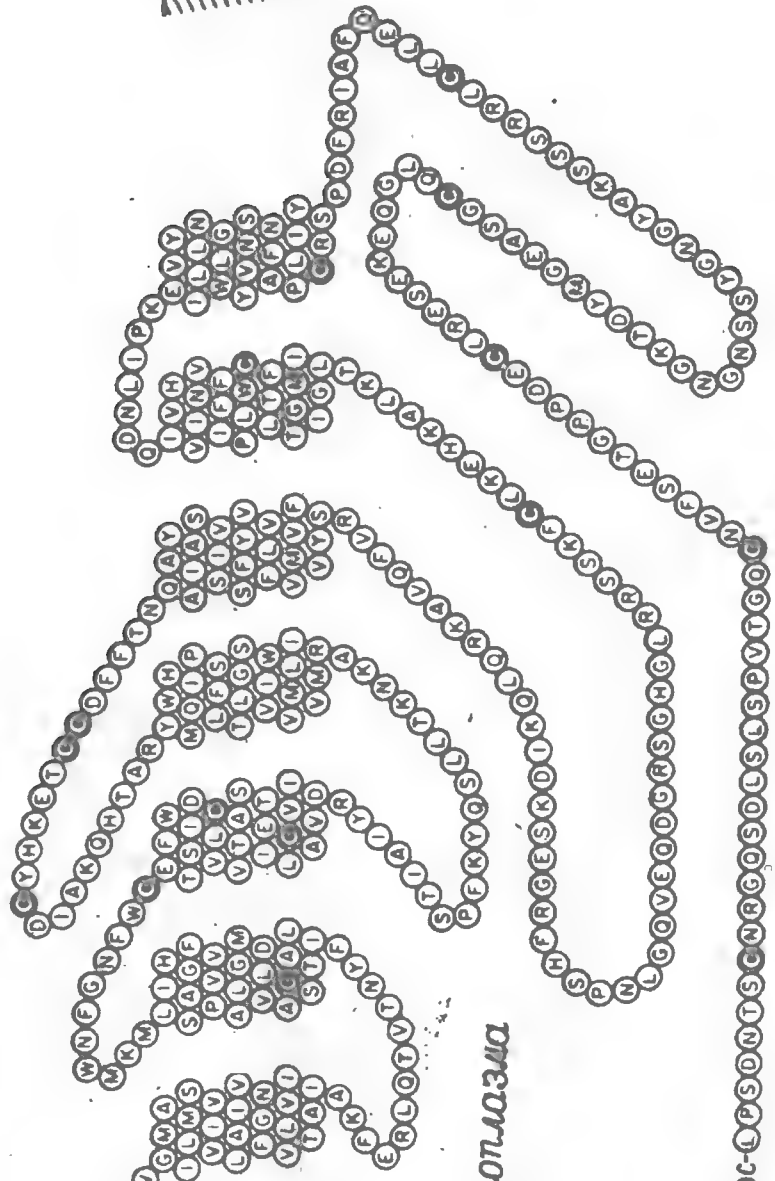
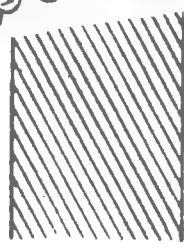
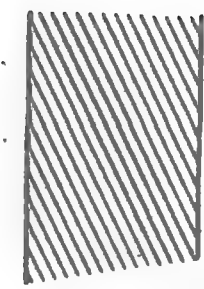
4. $(\alpha + \beta)$ -Белки, в которых α -спирали и отрезки β -структуры не чередуются, а скорее группируются с себе подобными так, что часть молекулы приобретает пространственную укладку чисто α -спирального типа (тип 1, см. выше), другая — чисто β -типа (тип 2), нередко с элементами (α/β) -структуры. К этому типу относится лизоцим куриного яйца (рис. 6.9).

6.9. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Сказанное выше справедливо для глобулярных белков, функционирующих в водном окружении, — белков цитозоля и секреторных. Иные закономерности управляют формированием структуры мембранных белков, точнее, интегральных белков, пронизывающих мембрану. Белки, локализованные на поверхности мембраны, содержат специализированный гидрофобный домен, выполняющий роль якоря, или иную гидрофобную структуру, например ковалентно связанный липидный фрагмент, в остальном же их пространственное строение определяется обычными для всех белков правилами. Интегральные белки, включе-

PVMSGNTTLLFDSDNGPPGM NH₂

Внеклеточное пространство



Цитоплазма

HOOC-LPSONTSCNRRGOSDLSLSPVTGGC A

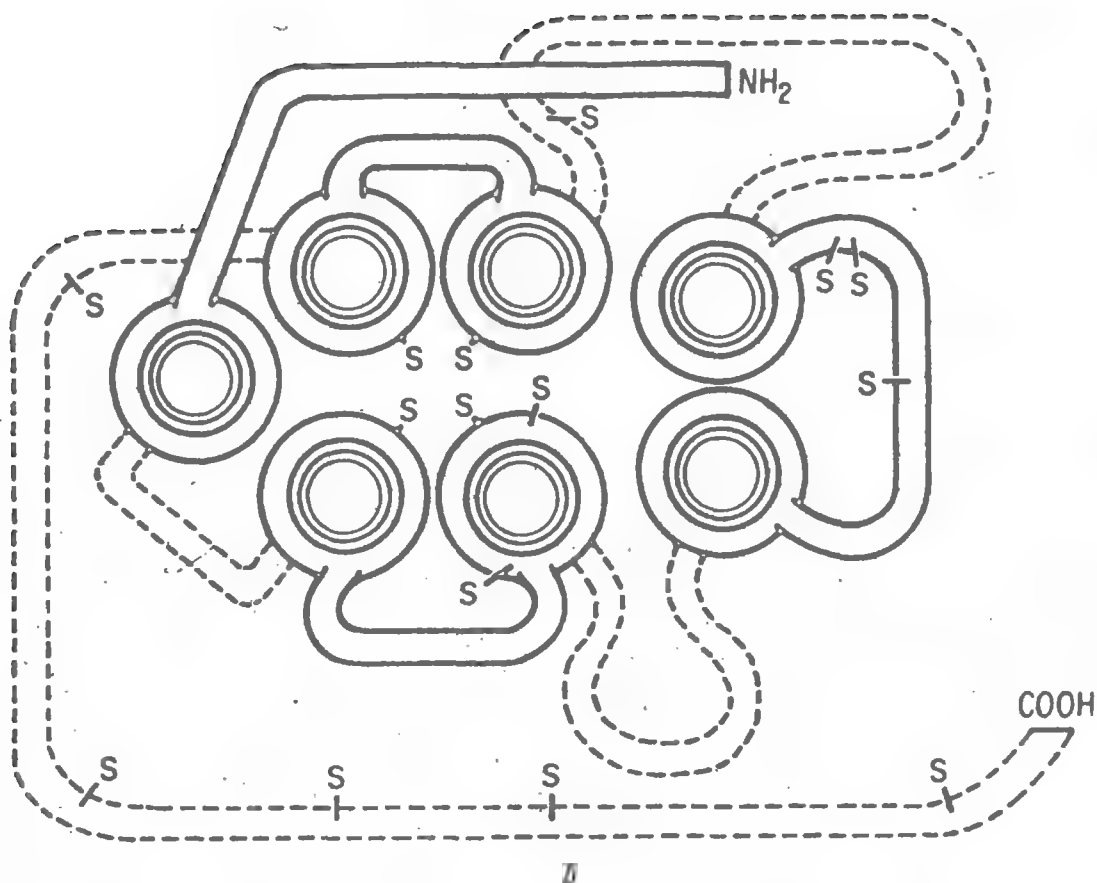


Рис. 6.10. Гипотетическая схема ориентации структурных элементов трансмембранного белка — β_2 -адренэргического рецептора в мембране:

А — мембрану (заштрихована) пронизывают семь α -спиральных участков, очень богатых гидрофобными аминокислотами. Петли, показанные в верхней части рисунка, выступают во внеклеточное пространство и участвуют в связывании эффектора, в нижней — направлены в цитозоль и обеспечивают взаимодействие с G-белком, передающим сигнал. Зачернены остатки цистеина;

Б — та же схема, рассматриваемая со стороны внеклеточного пространства; S обозначает атомы серы цистеина или цистина. Сплошными линиями показаны внеклеточные участки полипептидной цепи, прерывистой — внутриклеточные

ние которых в мембрану происходит котрансляционно, видимо, вообще не могут удерживать нативную структуру в чисто водном окружении. Они содержат несколько трансмембранных фрагментов, преимущественно образованных отрезками α -спиралей, содержащих гидрофобные аминокислоты. Последние соединяются внеклеточными петлями, направленными как в цитозоль, так и во внешнюю среду (рис. 6.10).

Внешние петли в мембранных белках эукариот, как правило, сильно гликозилированы, что усиливает их гидрофильность. Внутримембранные α -спирали могут контактировать друг с другом, образуя пучки; однако внутреннего гидрофобного ядра они не формируют. Отсутствует и фактор, вызывающий его образование, — трансмембранные участки белка контакта с водой не имеют.

Тем большая роль в поддержании единой структуры может принадлежать ван-дер-ваальсовым силам (которые действуют между боковыми цепями аминокислот, образующих α -спирали), электростатическим взаимодействиям погруженных в неполярную среду ионизованных групп и диполей, присущих α -спиралям. Определенную роль могут играть и дисульфидные связи, соединяющие трансмембранные α -спирали. Наконец, внемембранные домены, формируя свою структуру по обычным правилам, могут стабилизировать целостность третичной структуры этих белков, выполняя роль своеобразных организаторов. Трансмембранными могут быть и участки β -структуры.

Исследование строения трансмембранных белков, которым принадлежат столь важные функции, как транспорт молекул внутрь клетки, межклеточные взаимодействия, образование ионных каналов и передача внешних сигналов в клетку, весьма сложно. В отдельных случаях удается получить их кристаллы, заменив их естественное окружение — липиды — синтетическим поверхностноактивным веществом. Дальнейшее изучение таких кристаллов идет обычным путем. В более сложных ситуациях прибегают к ограниченному протеолизу, расщепляющему внемембранные участки полипептидной цепи, химической модификации, направленной на эти же участки. Общую укладку элементов вторичной структуры удастся наблюдать, используя электронный микроскоп.

6.10 ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКА

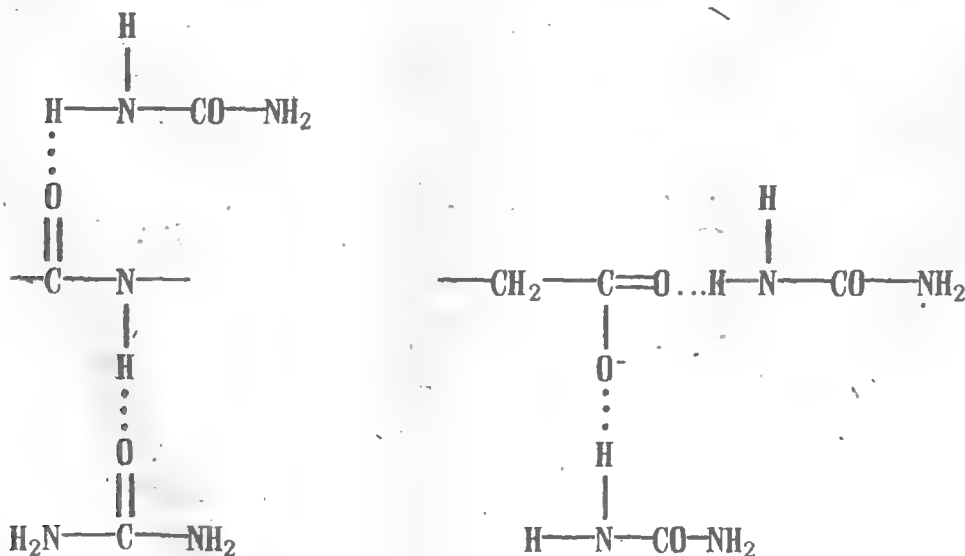
Денатурацией называют существенное изменение вторичной и третичной структуры белка, т.е. нарушение, разупорядочение системы нековалентных взаимодействий, не затрагивающее его ковалентной структуры. Денатурация, как правило, сопровождается утратой белком функциональных свойств, его инактивацией. Однако инаktivация сама по себе не может служить надежным критерием денатурации. К денатурации не следует относить конформационные переходы в белке, при которых одна кооперативная система нековалентных взаимодействий перестраивается в другую. Принципиальная разница состоит в том, что в этом случае оба состояния упорядочены, тогда как характерным признаком денатурации является именно утрата упорядоченности, которая приводит к возрастанию энтропии системы.

Понятие "существенности" изменения пространственной структуры в приведенном выше определении денатурации не поддается количественной оценке. Чаще всего приходится иметь дело с достаточно резким, скачкообразным переходом от нативного состояния к денатурированному, что диктуется кооперативностью третичной структуры

белка. Однако встречаются, по-видимому, и случаи, когда белок претерпевает частичную денатурацию, например вследствие утраты пространственной организации одним из образующих его доменов или нарушения системы нековалентных взаимодействий в каком-либо участке супервторичной структуры.

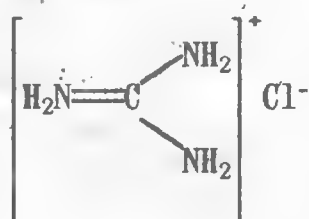
Качественное рассмотрение показывает, что денатурация белка может быть вызвана действием ряда факторов. Так, *повышение температуры* приводит к возрастанию вклада энтропийного фактора, что обуславливает *тепловую денатурацию*, происходящую, как правило, скачкообразно. Температура денатурации белков весьма различна и существенно зависит от других условий, например многие белки заметно стабилизируются ионами кальция. Некоторые белки отличаются термостабильностью. Это особенно свойственно белкам термофильных организмов, адаптировавшихся к жизни при повышенных температурах. Например, протеолитический фермент, секретируемый термофильными бактериями, — термоллизин — сохраняет активность до 80 °С.

Денатурации способствует *воздействие на белок реагентов, нарушающих нековалентные взаимодействия*, прежде всего систему водородных связей. Как уже отмечалось, стабильность пространственной структуры белка требует образования не менее 90% возможных водородных связей внутри белковой глобулы. Понятно, что разрыв значительной их части вызовет кооперативный переход нативной структуры в денатурированное состояние. Чаще всего для денатурации белка применяют концентрированные (6–8 М) растворы мочевины. Молекула мочевины как бы имитирует пептидную связь и способна выступать и как донор, и как акцептор водородных связей, конкурируя с пептидными группировками и другими функциональными группами белка, образующими в нативной структуре внутримолекулярные водородные связи:



Денатурация белка при увеличении содержания мочевины в растворе происходит скачком, как правило, в небольшом интервале ее концентрации. Например, денатурация лизоцима наблюдается при переходе от 3,2 к 4,0 М раствору мочевины. Заметим, что денатурирующее действие высоких концентраций мочевины может быть связано и с нарушением структуры воды опять-таки за счет образования ею водородных связей с молекулами мочевины. Это должно привести к резкому ослаблению стабилизирующей роли гидрофобных контактов.

Еще более сильным денатурирующим агентом является *солянокислый гуанидин* (обычно 6 М раствор)



В этом случае действуют те же факторы, что и при использовании мочевины: конкуренция с пептидными и функциональными группами белка за водородные связи и нарушение структуры воды. В дополнение к ним сказывается и очень высокая ионная сила — гуанидин является очень сильным основанием и практически всегда полностью протонирован, поэтому в концентрированных его растворах исключаются внутрибелковые электростатические взаимодействия и, следовательно, устраняется еще один из факторов, способных стабилизировать пространственную структуру.

Денатурирующим действием на белки обладают и органические растворители. Они способны устанавливать контакты с гидрофобными аминокислотными остатками белка, лишая гидрофобное ядро его стабилизирующей роли. Одновременно многие растворители, например спирты, формамид, муравьиная кислота, как бы переключают на себя водородные связи, поддерживающие третичную структуру. С дальнейшим повышением концентрации растворителя может нарушиться и структура воды, что устранит фактор, от которого зависит формирование внутримолекулярных гидрофобных контактов в белковой глобуле.

Денатурирующее действие органических растворителей весьма индивидуально и зависит от природы растворителя, белка, других условий (например, температуры). Учет этих факторов позволяет в ряде случаев избежать денатурации и применять органические растворители при фракционировании белков, их хроматографии, а иногда и проводить реакции с участием ферментов в органических растворителях. В таких случаях, по-видимому, важно, чтобы белок сохранял те

молекулы воды, которые связаны водородными связями с функциональными группами на его поверхности, т.е. гидратную оболочку. Известны и белки, легко переносящие высокие концентрации органических растворителей.

Эффективными денатурирующими агентами являются ионные детергенты, среди которых особенно часто используют анионный детергент — додецилсульфат натрия:



Его длинная гидрофобная цепь образует контакты с гидрофобными остатками белка, что при концентрации детергента около 0,5 мМ приводит к полному разворачиванию третичной структуры. Взаимное отталкивание практически всегда отрицательно заряженных сульфатных групп влечет за собой вытягивание комплекса додецилсульфат — белок в палочковидную структуру, несущую столь большое число отрицательных зарядов додецилсульфата, что вклад собственных ионных групп белка оказывается, как правило (но не всегда!), малосущественным. Такой способ денатурации нашел широкое применение при электрофоретических исследованиях белков в полиакриламидном геле.

Как и при действии других денатурирующих агентов, разворачивание белка в присутствии додецилсульфата происходит скачкообразно. Например, бактериальная рибонуклеаза — барназа — при 0,65 мМ детергента и 37 °С связывает сразу 14 молекул додецилсульфата на одну молекулу белка, состоящую из 110 аминокислотных остатков. При меньших концентрациях реагента белок сохраняет стабильность и комплекса с детергентом практически не образует.

Подвижность отрицательно заряженных комплексов додецилсульфат — белок в силу примерно одинаковой плотности заряда (как правило, связывается практически постоянное количество додецилсульфата: примерно 0,4 г на 1 г белка), а также одинаковой (палочковидной) формы комплексов определяется только длиной полипептидной цепи. Это сделало электрофорез в присутствии додецилсульфата наиболее распространенным способом определения молекулярной массы полипептидных цепей. Сказанное справедливо, если в белке нет дисульфидных связей, которые не позволяют цепи развернуться в линейную структуру. Ввиду этого денатурацию додецилсульфатом натрия обычно дополняют восстановлением дисульфидных связей меркаптоэтанолом или дитиозритритом. Иногда обработку детергентом ведут при 100 °С, добавляя в смесь концентрированную мочевины, с тем чтобы обеспечить наиболее полную денатурацию белка.

Денатурация белка может происходить и при экстремальных значениях pH. Так, в сильно кислых растворах полностью протонируются отрицательно заряженные карбоксильные группы остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот. Это приводит к тому, что на поверхности белка сохраняются только положительные заряды катионных групп, взаимное отталкивание которых приводит к разворачиванию глобулы, одновременно протоны разрывают ряд водородных связей. В щелочных растворах (при pH 11 и выше) утрачивают положительные заряды аминокислоты лизина и приобретают отрицательные — фенольные группы тирозина, что опять-таки ведет к резкому преобладанию отрицательных зарядов и разворачиванию глобулы. Этому же способствует и разрыв ряда водородных связей, в том числе образованных водородом фенольных групп тирозина. Известны, однако, белки, адаптированные, например, к высокой кислотности. Так, пепсин сохраняет свою структуру и активность при pH 1–2. Этому, видимо, благоприятствует почти полное отсутствие катионных групп в этом белке.

Установить полноту денатурации, т.е. полное исчезновение системы нековалентных взаимодействий, свойственных нативной структуре, довольно трудно. Обычно ограничиваются тем, что наблюдают за изменением какого-либо характерного для пространственной структуры белка физического параметра, например дисперсии оптического вращения или спектра флуоресценции, при углублении условий денатурации — повышении концентрации мочевины, росте температуры и т.п. Полагают, что денатурация завершилась, если наблюдаемый параметр достигает некоторого предельного значения, например если спектр флуоресценции перестает изменяться, достигнув формы, характерной для белка, в котором все остатки триптофана и тирозина равно доступны растворителю. Разумеется, это не дает полной гарантии исчезновения всех нековалентных контактов, однако можно надеяться на отсутствие протяженных элементов третичной структуры, сохраняющих кооперативность.

Денатурация белка нередко осложняется повреждением его ковалентной структуры. Так, продолжительное действие мочевины при повышенной температуре может сопровождаться карбамиллированием аминокислот лизина:



Лизин

Гомоцитруллин

(В действительности реакция, видимо, протекает с участием циановой кислоты HNCO , находящейся в равновесии с мочевиной.)

Довольно часто наблюдается гидролиз амидных групп аспарагина и глутамина (*дезамидирование*), в особенности если в белке есть последовательность Asp—Gly. К целому ряду повреждений, в том числе к расщеплению остатков цистина с образованием дегидроаланина, ведет щелочная обработка белков. Все эти факторы следует контролировать, что становится критически важным, если имеется в виду ренатурация белка — перевод денатурированного белка в нативное состояние.

6.11. РЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКА

Денатурацию белка в определенных условиях *in vitro* удается обратить, перейдя от развернутой полипептидной цепи к компактной глобуле, имеющей вполне определенную пространственную структуру. Этот процесс, называемый **ренатурацией**, моделирует, хотя и не в полной мере, свертывание полипептидной цепи в глобулу в ходе трансляции при биосинтезе белка

Как известно, пространственная структура белка определяется его первичной структурой. Известное соотношение один ген — один белок в сущности эквивалентно утверждению, что *генетически детерминированной последовательности аминокислот достаточно для того, чтобы однозначно предопределить ее свертывание в свойственную тому или иному белку третичную структуру*. Разумеется, в общем случае такое заключение справедливо лишь для условий, близких к существующим в данной клетке при биосинтезе данного белка, которые могут включать в себя определенный диапазон pH, присутствие некоторых ионов, например ионов кальция, а также кофакторов, присущих этому белку, например коферментов, гема и т.п.

При соблюдении указанных условий будет достигнуто рассмотренное выше соотношение факторов, от которого зависит стабильность белковой глобулы, т.е. создадутся термодинамические предпосылки формирования нативной структуры — ренатурации белка.

Это положение было подтверждено успешными опытами по ренатурации белков *in vitro*, проведенными впервые К.Анфинсеном и сотрудниками в 60-х годах, на панкреатической рибонуклеазе и лизоциме, а затем и на ряде других объектов.

Многие белки, в том числе обладающие внутримолекулярными дисульфидными связями, полностью денатурируют в присутствии высоких концентраций мочевины или солянокислого гуанидина с одновременным расщеплением дисульфидных связей восстанавливающими агентами (меркаптоэтанолом, меркаптоуксусной кислотой или

дитиоэритритом). Это, естественно, сопровождается их полной инактивацией.

При медленном удалении денатурирующего агента и восстановителя (например, диализом или гель-фильтрацией) происходят формирование нативной структуры, замыкание дисульфидных связей (для чего часто достаточно окисления кислородом воздуха) и полное восстановление активности белка. В специальных опытах была подтверждена правильность образования дисульфидных связей, что свидетельствует, в дополнение к реактивации, о восстановлении нативной структуры. На примере одного из белков — лизоцима — этот вывод был прямо подтвержден методом рентгеноструктурного анализа. Табл. 6.4 иллюстрирует эффективность ренатурации ряда белков.

Таблица 6.4. Ренатурация белков, денатурированных обработкой 8 М мочевиной или 6 М солянокислым гуанидином с одновременным восстановлением дисульфидных связей

Белок	Молекулярная масса, Да	Число S—S связей	Выход, %	
			теоретический*	достигнутый
Рибонуклеаза	18 000	4	1	95
Лизоцим	12 000	4	1	50–80
Такаамилаза**	40 000	4 + SH	0,3	48
Трипсиноген	25 000	4	1	60
Пепсиноген	38 000	3	6,7	50
Сывороточный альбумин	65 000	17	—	50

*Теоретический выход рассчитан в предположении, что дисульфидные связи образуются случайно.

** α -Амилаза *Aspergillus oryzae*.

Может показаться, что вывод о предопределенности пространственной структуры последовательностью аминокислот, подтверждаемый указанными выше опытами, не вполне строг. Дело в том, что экспериментальное доказательство полноты разрушения всех нековалентных взаимодействий при денатурации белка затруднено, поэтому нельзя исключить сохранения какой-то части ядра нативной структуры. Этот довод опровергается, однако, тем, что целый ряд (правда, небольших) белков удалось получить химическим синтезом их полипептидных цепей из производных аминокислот. Такие пептидные цепи неизменно

давали при ренатурации хороший выход активного (и, значит, нативного) белка (см. гл. 2).

Несмотря на успешное образование нативной структуры, ренатурация белков *in vitro* протекает весьма медленно, что не соответствует высокой скорости свертывания третичной структуры в физиологических условиях. По-видимому, наиболее существенна трудность выбора оптимального, кинетически выгодного пути перехода от развернутой полипептидной цепи к компактной пространственной структуре. Число всех возможных способов свертывания достаточно длинной полипептидной цепи настолько велико (среди них окажется множество непродуктивных, тупиковых), что переход к правильной структуре простым перебором различных конформаций потребовал бы огромного времени.

Реальное свертывание белка, очевидно, происходит по *одному*, во всяком случае *нелинному* пути, что резко сокращает время формирования нативной структуры. Свертывание полипептидной цепи *in vivo* по необходимости синхронизировано с ее биосинтезом, что уже открывает возможность выбора определенного пути, так как формирование пространственной структуры может происходить котрансляционно. Более того, при свертывании белка в физиологических условиях может быть существенной та конформация, в которой полипептидная цепь покидает пептидилтрансферазный центр рибосомы, и даже темп образования цепи — есть данные о задержках трансляции на участках цепи, являющихся границами между элементами вторичной структуры.

Понятно, что при ренатурации белка *in vitro* оба указанных фактора работать не могут и она (хотя и в этом случае протекает не случайным образом, а по ограниченному числу путей) требует для поиска этих путей гораздо более значительного времени, чем *in vivo*.

Существование *определенного пути свертывания полипептидной цепи*, считавшееся до недавнего времени весьма вероятной гипотезой, поддерживает ряд экспериментальных фактов. Так, дисульфидные связи в панкреатическом ингибиторе трипсина и рибонуклеазе замыкаются в определенном порядке, причем не обязательно сразу происходит образование "правильных" связей, т.е. тех, которые существуют в конечной форме — нативном белке. Иногда наблюдается временное образование дисульфидной связи между остатками цистеина, которые, видимо, сближаются в промежуточном соединении. Впоследствии такая дисульфидная связь вступает в реакцию обмена с другими, еще не окисленными остатками цистеина и расщепляется, уступая место связям, характерным для нативной конформации.

Применение метода направленного мутагенеза (белковой инженерии) показало, что наряду с аминокислотными остатками, критически

важными для формирования устойчивой пространственной структуры белка, встречаются и такие, замена которых иными не сказывается на стабильности белковой глобулы, но серьезно влияет на кинетику свертывания полипептидной цепи. Следовательно, эти аминокислотные остатки важны для возникновения промежуточных структур на пути к нативной, устойчивой глобуле.

Так, при свертывании α -субъединицы триптофансинтетазы (рис. 6.11) наблюдается промежуточная ступень, на которой крупный N-концевой домен (содержащий аминокислотные остатки 1—

188 и образованный шестью отрезками параллельной β -структуры и пятью α -спиралями) уже свернут, тогда как C-концевой фрагмент (начинающийся со 189-го остатка и формирующий в нативном белке два отрезка β -структуры и три α -спирали; всего 80 аминокислотных остатков) еще денатурирован, неупорядочен. Заметим, что в этом белке нет пространственно отграниченных доменов — его структура достаточно компактна, речь идет о доменах как промежуточных формах свертывания α -субъединицы.

Среди мутантов этого фермента были отобраны такие, которые затрагивают контакты между N- и C-концевыми доменами. Phe-22 N-концевого домена, контактирующий с 8-м β -структурным отрезком в C-концевом домене, был заменен на Leu. При этом замедлились скорости денатурации и ренатурации, но не была затронута стабильность белка. Очевидно, что это обусловлено понижением стабильности переходного состояния при свертывании. Замена Gly-234 в C-концевом домене на аспарагиновую кислоту замедлила разворачивание в большей мере, чем свертывание. Поскольку первый и восьмой β -структурные отрезки, в которые включены соответственно фенилаланин и глицин,

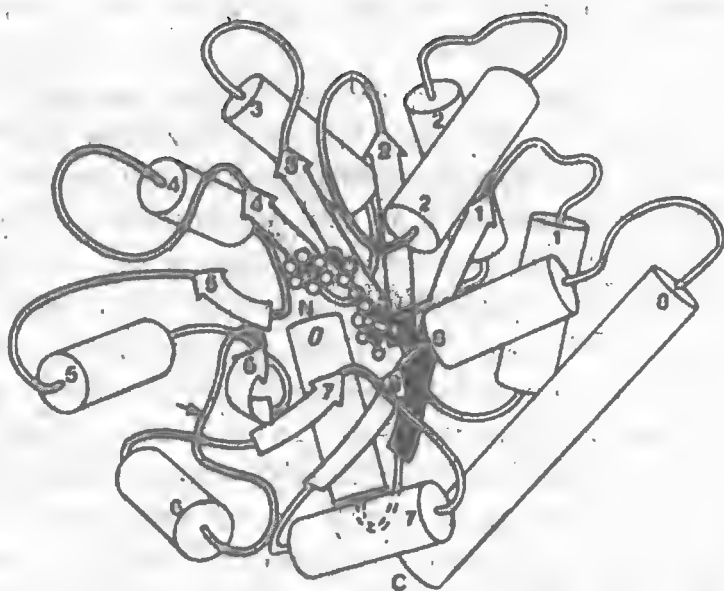


Рис. 6.11. Третичная структура α -субъединицы триптофансинтетазы.

Образована, как и триозофосфатизомераза, чередующаяся α -спиралями (цилиндры) и отрезками β -структуры (стрелки). Маленькими кружками в центре показано место связывания ингибитора. Стрелкой обозначена граница между N- и C-концевыми доменами, в этом районе по остатку Arg-188 происходит гидролиз трипсином, который приводит к разделению доменов. Номера указывают порядок расположения элементов вторичной структуры

сближены в третичной структуре свернутой субъединицы, их взаимное "причаливание" играет, по-видимому, важную роль в формировании промежуточного продукта свертывания, ускоряя процесс ренатурации.

Исследование кинетики ренатурации ряда белков позволяет в первом приближении так описать этот процесс. Сначала быстро образуются короткие отрезки вторичной структуры — α -спирали, β -листы, β -изгибы. Понятно, что каждый такой участок сам по себе, до образования компактной глобулы, недостаточно стабилен, поэтому соответствующие элементы вторичной структуры то возникают, то распадаются, "мерцают" (рис. 6.12).

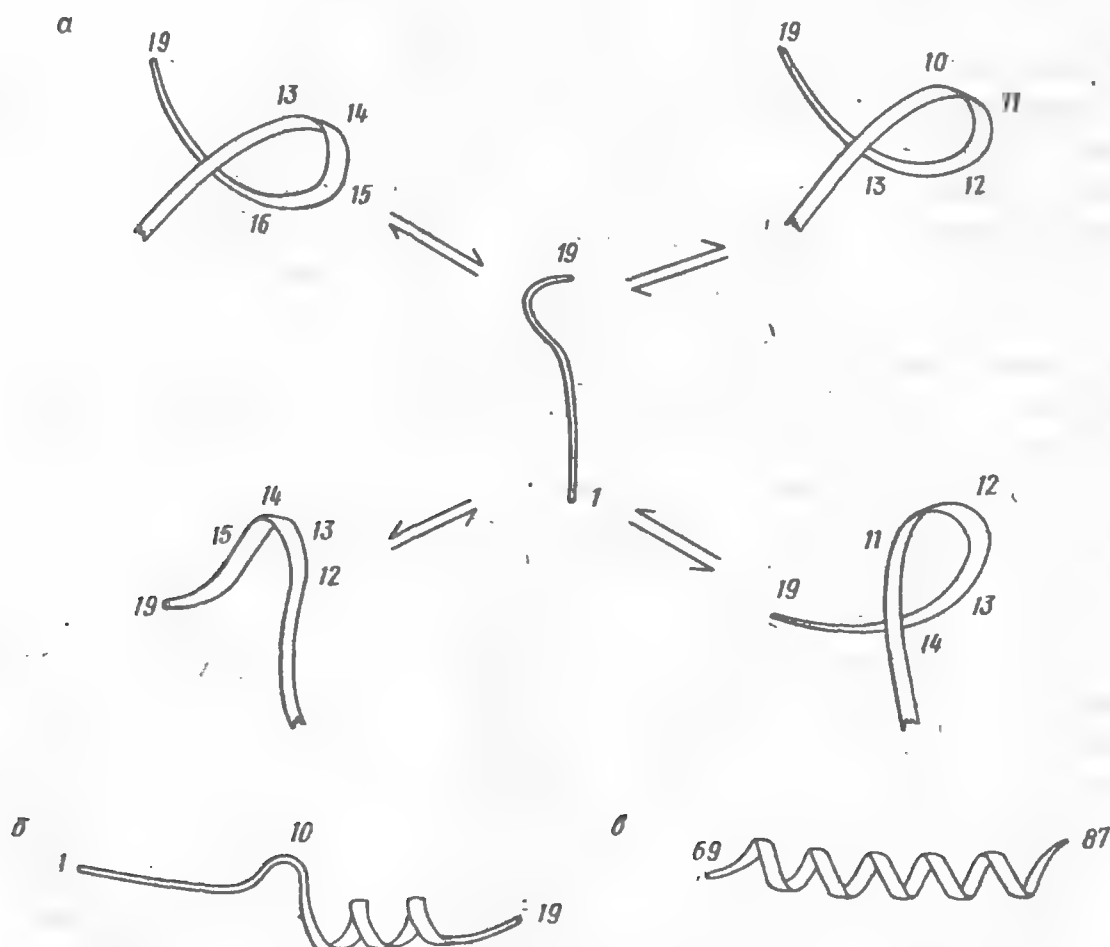


Рис. 6.12. Конформационные состояния фрагмента 69-87, соответствующего С-концевой α -спирали миогемэритрина (по данным ЯМР):

а — набор неустойчивых конформаций, которые пептид принимает в воде; *б* — преимущественная конформация пептида в менее полярной среде (смесь вода — трифторэтанол), при которой С-концевая часть образует α -спираль; *в* — конформация пептида в компактной структуре миогемэритрина — α -спираль охватывает всю последовательность; цифрами обозначены номера остатков в пептиде *а* и *б* и соответствующем фрагменте миогемэритрина (*в*)

Затем такие участки относительно организованной структуры, составляющие в совокупности фрагмент полипептидной цепи из 50—150 аминокислот (будущий домен белка), как бы "схлопываются" за счет нековалентных взаимодействий. При этом образуется так называемая расплавленная глобула, которая в целом близка к нативной пространственной структуре и отличается от нее меньшей компактностью и иным размещением боковых цепей аминокислотных остатков. Далее происходит уточнение структуры на уровне доменов, после чего устанавливается контакт между последними. Этими относительно медленно протекающими стадиями завершается формирование белковой глобулы, и она приобретает активность.

В свете обсужденных данных о ренатурации белков *in vitro* очевидно, что свертывание белка, предопределенное его первичной структурой, может быть во многих случаях воспроизведено с достаточно хорошим выходом. Помимо рассмотренных выше кинетических ограничений следует учитывать и то, что *in vivo* пространственная структура в норме формируется каждой вновь синтезированной молекулой в отдельности, без накопления развернутых, денатурированных структур.

Роль последнего фактора стала особенно очевидной при сверхсинтезе чужеродных белков в микробных клетках. В таких системах нередко наблюдается накопление внутри клеток-продуцентов так называемых тел включения, которые представляют собой агрегаты денатурированных пептидных цепей. Если белок содержит дисульфидные связи, в таком агрегате они образуются беспорядочно, во многих случаях межмолекулярно. Возникновение агрегатов можно объяснить тем, что при интенсивно протекающем сверхсинтезе одновременно на многих рибосомах образуются лишние структуры пептидных цепей, появление которых значительно опережает процесс свертывания. Как следствие, молекула не успевает "перебрать" промежуточные конформации и найти путь свертывания. Вместо этого она агрегирует с соседними, также еще не свернутыми полипептидными цепями.

Как правило, отделение тел включения от других компонентов клетки проходит без затруднений, что облегчает их очистку. Однако в дальнейшем возникает непростая проблема ренатурации полученного белка, для которой во многих случаях так и не удается отыскать удовлетворительное решение. Обычный прием состоит в том, что агрегированный белок сначала переводят в раствор и добиваются полного разрушения агрегатов, применяя концентрированную мочевины или солянокислый гуанидин в присутствии соединений, восстанавливающих дисульфидные связи (например, меркаптоэтанол). Затем прибегают к более или менее плавному удалению денатурирующего реагента и восстановителя, создавая условия постепенной ренатурации белка,

причем поддерживают низкую концентрацию последнего. Для образования дисульфидных связей применяют мягко действующую окислительно-восстановительную систему, например смесь 10 мМ окисленного и 1 мМ восстановленного глутатиона. В ряде случаев такой прием дает хорошие результаты: так, практически количественно проходит ренатурация интерлейкина-2, полипептидная цепь которого состоит из 133 аминокислот и содержит одну дисульфидную связь и один "непарный" остаток цистеина.

Ренатурация мембранных белков представляет собой отдельную задачу. Трансмембранный белок — бактериородопсин — после его экстракции из мембраны и хроматографической очистки в смеси органических растворителей удалось ренатурировать, поместив в смесь фосфолипида и поверхностно-активного соединения. Очевидно, что и в этом случае самосборка белка в присутствии липида приводит от денатурированной молекулы к структуре, свернутой так же, как нативный белок.

Таким образом, ренатурация белка принципиально возможна и во многих случаях практически осуществима, однако ряд препятствий, преимущественно кинетических, может серьезно затруднить, а иногда полностью остановить этот процесс. Необходимо подчеркнуть, что способность полипептидной цепи белка самопроизвольно образовывать пространственную структуру еще не означает, что *в реальных условиях биосинтеза* этот процесс протекает без участия внешних факторов, в том числе ряда белков, выступающих как *катализаторы* свертывания полипептидной цепи.

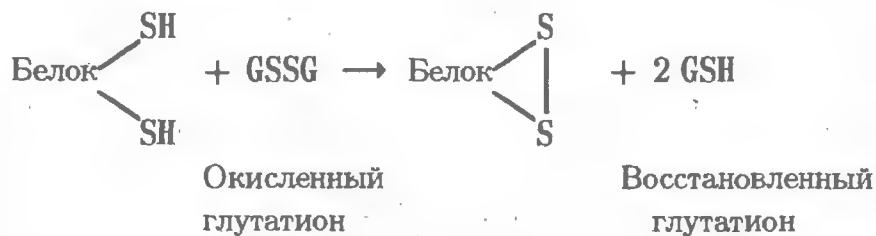
Одной из причин замедленного формирования пространственной структуры белка *in vivo* могла быть задержка в образовании дисульфидных связей. Существует так называемый перегруппировывающий фермент — *протеиндисульфидизомераза*, — ускоряющий перебор возможных дисульфидных связей и тем самым поиск правильно образованных. В его присутствии ренатурация протекает гораздо быстрее. Так, 70%-ная ренатурация панкреатической рибонуклеазы при действии этого фермента, выделенного из печени, происходит уже за 30 мин, тогда как спонтанная реактивация за это время так мала, что еще не обнаруживается.

Протеиндисульфидизомераза в эукариотических клетках содержится в эндоплазматическом ретикулуме и является димерным белком, каждая из субъединиц которого содержит два домена, структурно близких тиоредоксину, небольшому белку, участвующему в окислительно-восстановительных процессах. Каждый из этих доменов, видимо, и содержит каталитический центр, в котором имеется группировка из двух остатков цистеина (восстановленная форма), способных рас-

щеплять дисульфидную связь в белке-субстрате, образуя за этот счет собственную дисульфидную связь (окисленная форма). В свою очередь, окисленная форма протеиндисульфидизомеразы, реагируя со свободными SH-группами цистеина в субстрате, вызывает образование в этом белке дисульфидной связи, чем и обусловлен быстрый перебор в нем всех возможных дисульфидных мостиков:



Видимо, такую же роль может играть и сам тиоредоксин, причем *in vivo* катализируемый этими ферментами дисульфидный обмен сочетается с образованием все большего числа дисульфидных связей в белке-субстрате за счет действия системы восстановленный глутатион → окисленный глутатион по схеме



В ряде случаев медленной стадией, лимитирующей скорость ренатурации белка, оказывается *цис,транс-изомеризация* отдельных пептидных связей, прежде всего образованных иминогруппой пролина. Как уже отмечалось при обсуждении вторичной структуры (см. гл. 5), разница в энергии таких *цис*- и *транс*-пептидных связей невелика, поэтому переход одного изомера в другой при денатурации белка вполне вероятен. Обратный переход из *цис*-формы, как правило, неблагоприятной для свертывания, в *транс*-форму — ту, в которой и существует подавляющее большинство пептидных связей в белке, также требует определенной энергии активации. Ввиду этого молекула, еще не завершившая образование пространственной структуры, вынуждена как бы "дождать" благоприятной изомеризации пептидной связи пролина.

Существует весьма распространенный фермент — *пролил-цис,транс-изомераза* (в эукариотических клетках это *циклофилин*, способный специфически связывать антибиотик — иммунодепрессант циклоспорин). Он катализирует цис,транс-изомеризацию пептидных связей пролина и тем ускоряет свертывание цепи в компактную структуру.

Заметим, что два упомянутые фермента, катализирующие ренатурацию белка, все же далеко не обеспечивают тех скоростей свертывания полипептидной цепи, которые соответствовали бы скорости трансляции. Установлено, что при формировании пространственной структуры белка *in vivo* полипептидная цепь не предоставлена сама себе, а взаимодействует с целым рядом специализированных белков, получивших название *шаперонов*, функция которых — обеспечить быстрое нахождение правильной пространственной структуры.

Известен ряд семейств шаперонов, которых особенно много среди так называемых *белков теплового шока*. Последние названы так, потому что они синтезируются клетками в больших количествах в ответ на воздействия, неблагоприятные для эффективного свертывания третичной структуры белков, в частности на повышение температуры. Однако они образуются и действуют и в нормальных условиях.

Одно из семейств шаперонов составляют так называемые *стресс-белки 70* эукариотических клеток, имеющие молекулярную массу около 70 кДа. Они образуют комплексы с еще не завершившими свертывание полипептидными цепями, предотвращая их взаимодействие между собой и нежелательную агрегацию. Эти белки состоят из двух взаимодействующих между собой доменов. Один из доменов образует комплекс с участками развернутой полипептидной цепи, другой — связывает АТР и способен расщеплять его, являясь медленно действующей АТРазой. При гидролизе АТР белок переходит в другое конформационное состояние и его комплекс с полипептидной цепью распадается.

Полипептидные цепи белков, которые подлежат транспорту из цитоплазмы, за счет образования комплексов со стресс-белками 70 удерживаются в развернутом, наиболее приспособленном для переноса через мембрану состоянии. Продолжительность жизни таких комплексов задается, по-видимому, временем, требующимся для внутримолекулярного гидролиза АТР, связанного стресс-белками 70 (ср. гл. 12). Пока не ясно, катализируют ли эти белки непосредственно само образование вторичной или третичной структуры. Не исключено, что их роль ограничивается предотвращением нежелательных для этого процесса межмолекулярных взаимодействий, агрегации еще не свернутых полипептидных цепей.

Еще одну группу широко распространенных белков, вовлеченных в формирование третичной структуры, составляют так называемые *шаперонины* — белки, кодируемые генами GroEL и GroES у *E.coli*. Белки GroEL образованы субъединицами с молекулярной массой около 60 кДа, которые формируют своеобразную четвертичную структуру, построенную из двух лежащих одно на другом колец по семь субъединиц в каждом. Предполагают, что частично свернутая полипептидная цепь располагается на поверхности такого кольца. Отдельные ее участки, связанные субъединицами шаперонина с различной прочностью, могут высвобождаться из комплекса и формировать свойственную им вторичную структуру, не встречая помех со стороны соседних участков или других полипептидных цепей, удерживаемых в связанном состоянии. В таких условиях формирование регулярных элементов вторичной структуры происходит как бы поочередно. По завершении этого процесса комплекс распадается, что зависит, как и в рассмотренном выше случае, от расщепления АТР, связанного GroEL-белком. Белки GroES с молекулярной массой 10 кДа ассоциируют с белком GroEL и каким-то образом регулируют его АТР-зависимую активность и, значит, время жизни комплекса.

6.12. О СООТНОШЕНИИ МЕЖДУ ПЕРВИЧНОЙ И ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРАМИ

ВЕЛИКА

Положение о том, что *последовательность аминокислотных остатков полипептидной цепи белка несет в себе всю информацию, необходимую и достаточную для формирования однозначной пространственной структуры*, относится к числу фундаментальных принципов молекулярной биологии. Границы приложимости этого принципа и некоторые особенности его реализации требуют комментариев.

Прежде всего этот принцип еще не означает, что любая случайно заданная последовательность аминокислот обязательно даст устойчивую компактную структуру — ведь богатый экспериментальный материал, который обобщен в этом положении, относится к *эволюционно отобраным* первичным структурам, а не к случайным последовательностям аминокислотных остатков. Пока, видимо, трудно дать решение этой проблемы в общем виде, она все еще остается дискуссионной. Распространено мнение, что однозначное соотношение между последовательностью аминокислот и пространственной структурой является уникальным свойством относительно небольшой доли всех возможных первичных структур — именно тех, которые были отобраны в ходе эволюции белков.

Согласно иной точке зрения, круг последовательностей, способных к свертыванию в компактную глобулу, гораздо шире. Очевидно лишь, что *такими свойствами обладает далеко не любая последовательность аминокислот*. Так, фрагмент 1—126 нуклеазы стафилококков (белка, содержащего 149 аминокислотных остатков в пептидной цепи) не образует сколько-нибудь устойчивой пространственной структуры, хотя по размеру он вполне сравним с множеством небольших белков. Панкреатическая рибонуклеаза (содержит 124 аминокислотных остатка в полипептидной цепи) после отщепления четырех остатков с карбоксильного конца утрачивает способность к ренатурации. По-видимому, не является компактным, хотя и содержит элементы вторичной структуры, β -казеин. Известно немало мутантов природных белков, в которых одна аминокислотная замена полностью дестабилизирует структуру. Следовательно, существуют полипептидные цепи, не способные в обычных условиях свернуться в компактную однозначную пространственную структуру.

Однако тенденция к образованию более или менее компактной, пусть еще несовершенной пространственной структуры присуща, по-видимому, достаточно широкому набору последовательностей аминокислот.

В то же время нет полной уверенности, что данной последовательности аминокислот обязательно соответствует одна и только одна пространственная структура, единственный минимум свободной энергии. Иными словами, вопрос сводится к возможности существования двух (или более) альтернативных пространственных структур для одной и той же последовательности аминокислот. В большинстве изученных случаев ренатурация приводит к восстановлению нативной структуры белка; имеются лишь указания на возможность образования третичной структуры, отличающейся от нативной, при ренатурации яичного альбумина. Если последний факт и верен, то он выглядит исключением.

Учитывая это, следует полагать, что для полипептидных цепей существующих в природе белков соответствие первичная структура — пространственная структура в подавляющем большинстве случаев, действительно, однозначно. Это, разумеется, не означает, что тот или иной белок не может под воздействием внешних факторов, например образования комплекса с каким-либо лигандом, принимать различные конформации. Такая ситуация вполне реальна, более того, типична. Обсуждается иное — возможно ли, чтобы в *одинаковых условиях* белок мог образовывать две пространственно различные формы.

Необходимо иметь в виду и еще одну особенность соотношения между первичной и третичной структурами белка. Если данной после-

довательности аминокислот отвечает, как правило, единственный способ свертывания в пространстве, единственная третичная структура белка, то обратное положение неверно. Данному способу свертывания полипептидной цепи соответствует, как показывает опыт, не одна, а целое семейство последовательностей аминокислот. Иными словами, справедливо соотношение

Семейство первичных структур $\longleftrightarrow$ Пространственная структура

Очевидно, что должны существовать определенные закономерности, правила, своего рода *стереохимический код*, управляющий формированием пространственной структуры из данной последовательности аминокислот. Раскрытие этого кода — важнейшая задача физической химии белка, решение которой еще не достигнуто, несмотря на наличие ряда интересных подходов.

Тем не менее некоторые особенности стереохимического кода могут быть обсуждены. Прежде всего он вырожден, т.е. одной третичной структуре, одному способу укладки пептидной цепи отвечает, как уже отмечалось, набор последовательностей аминокислот. Так, весьма близкую пространственную структуру имеют глобины — содержащие гем белки, связывающие кислород, в том числе гемоглобины и миоглобины различных видов животных, легглобины растений и т.д. Эти пептидные цепи, отличающиеся составом и последовательностью аминокислот, состоят примерно из 140—150 остатков (см. гл. 8).

Поскольку все они дают при свертывании однотипную пространственную укладку полипептидной цепи, отличающуюся лишь в деталях, очевидно, что далеко не все аминокислотные остатки в равной мере ответственны за образование третичной структуры. Такое заключение подтверждается многими экспериментами по направленной замене аминокислотных остатков в отдельных позициях полипептидной цепи методом сайт-специфического мутагенеза. Так, замена остатка Pro-86 в лизоциме фага T4 на Gly, Ser, Cys, Leu, Asp, Arg и His влекла за собой небольшие по величине, хотя и простирающиеся иногда на 20 Å изменения в структуре. Тем не менее все эти мутантные белки почти не отличались от исходного по температурной стабильности и сохраняли в целом тот же способ укладки полипептидной цепи в пространстве.

Интересно, что гораздо значительнее изменилась их ферментативная активность, несмотря на то что точка замены отстоит на 24 Å от каталитического центра. Впрочем, нередки и такие случаи, когда замена единственного остатка резко влияет на стабильность белка. Показано, например, что замена в аденилаткиназе *E. coli* Ser-87 на Pro снижает содержание α -спиралей с 50 до 39% и делает структуру белка

неустойчивой при 40 °С, что приводит *in vivo* к глубокому протеолитическому расщеплению и полной утрате фермента.

Можно было бы думать, что существует определенное число аминокислотных остатков, которые решающим образом влияют на образование пространственной структуры. Однако *число инвариантных остатков*, т.е. аминокислот, неизменно занимающих одно и то же положение в полипептидных цепях достаточно многочисленного семейства эволюционно родственных белков, обычно *невелико*, подчас 20—30% или значительно меньше. Так, в белках оболочки вирусов растений, близких вирусу мозаики табака, из 158 остатков инвариантны 25 (16%), а в семействе карбоксипептидаз, включающем ферменты животных и некоторых микроорганизмов, примерно из 310 аминокислотных остатков — только 42 (13%). В семействе глобинов инвариантных остатков удивительно мало — всего шесть. Было бы чрезвычайно трудно представить себе, чтобы весь набор элементов вторичной структуры (в глобинах это α -спирали), а также все способы их укладки в третичную структуру могли диктоваться столь малым числом инвариантных аминокислотных остатков даже с учетом довольно крупной инвариантной структуры — гема.

Таким образом, следует искать какие-то другие общие черты в семействах первичных структур белков. Достаточно устойчивым признаком оказывается распределение по последовательности гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков. В особенности важно неперенное наличие в определенных позициях гидрофобных аминокислот (инвариантно гидрофобных остатков).

Например, в гемоглобинах млекопитающих 33 позиции в первичной структуре всегда заняты гидрофобными аминокислотами — инвариантно гидрофобны. Столь высокая значимость инвариантных гидрофобных остатков в первом приближении понятна — почти все они необходимы для формирования гидрофобного ядра. Гидрофобные остатки важны для организации контактов между элементами вторичной структуры при свертывании. Наконец, характерное распределение гидрофобных и гидрофильных остатков нужно для воспроизведения элементов вторичной структуры.

Разумеется, инвариантными гидрофобными остатками не исчерпываются те характерные черты, которыми определяется формирование пространственной структуры данной последовательностью аминокислот. По-видимому, существенно сохранение последовательностей определенного типа, *задающих повороты пептидной цепи*. Часто инвариантны остатки глицина, включение которых придает цепи гибкость, снимая многие ограничения на набор углов φ и ψ . Наконец, инвариантны и те аминокислотные остатки, которые, возможно, не участвуя в

формировании пространственной структуры, незаменимы для характерной функции белка, например входят в его активный центр.

Удивительно, что в некоторых случаях для образования правильной пространственной структуры не обязательна целостность собственно полипептидной цепи. Так, продукт ограниченного протеолиза панкреатической рибонуклеазы субтилизином — рибонуклеаза S — содержит один разрыв полипептидной цепи после Ala-20. Пептидный фрагмент 1—20 может быть отделен от остаточного белка (21—124), однако при смешении они вновь формируют активную рибонуклеазу S, третичная структура которой лишь в точке разрыва цепи отличается от строения исходной рибонуклеазы.

Та же панкреатическая рибонуклеаза, в полипептидной цепи которой содержится 124 аминокислотных остатка, после отщепления четырех аминокислот с карбоксильного конца утрачивает способность к свертыванию. Дисульфидные связи при окислении предварительно восстановленного фрагмента 1—120 образуются неправильно, не в том порядке, который свойствен нативному белку. Однако в присутствии С-концевого пептида 105—124 происходит регенерация структуры и активности фермента. Для нуклеазы стафилококков (149 аминокислотных остатков) показано, что при смешивании фрагментов 1—126 и 49—149 их взаимодополняющие участки, например 1—48 и 49—149, образуют глобулу, а оставшийся лишним фрагмент 49—126 не входит в компактную структуру и может быть отщеплен трипсином, если ренатурированный фермент стабилизирован присутствием аналога субстрата.

Ренатурация белка из двух фрагментов, иногда перекрывающихся, может быть, видимо, объяснена тем, что соответствующие участки первичной структуры способны, каждый сам по себе, образовывать элементы "мерцающей" вторичной структуры, которые при взаимодействии фрагментов быстро находят путь к закреплению уже значительно более стабильной пространственной структуры. Разумеется, нельзя считать, что ренатурировать, образуя единую третичную структуру, могут фрагменты, полученные каким угодно способом, — разрыв цепи должен происходить на разрешенном участке, выбранном так, чтобы фрагменты могли с известной вероятностью автономно формировать элементы вторичной и, возможно, третичной структуры. Ренатурация белка из крупных фрагментов пептидной цепи, видимо, близка к комплементации — восстановлению активности белка при смешивании двух неактивных полипептидных цепей, несущих мутации в разных сайтах.

Итак, код, определяющий однозначность соотношения между способом укладки полипептидной цепи в пространстве (третичной струк-

турой) и целым семейством аминокислотных последовательностей, несомненно, вырожден. Однако меру этой вырожденности не следует переоценивать, поскольку речь идет об устойчивости важной, но не исчерпывающей специфику белка характеристики — способа свертывания полипептидной цепи в пространстве. Эта устойчивость позволяет, пользуясь одной и той же третичной структурой, иметь множество пространственных структур, отличающихся распределением функциональных групп на поверхности белка и, значит, имеющих различные функциональные возможности. Заметим, что *однотипность* способа пространственной укладки пептидных цепей, принадлежащих одному семейству, не означает *идентичности* — возможны отличия в деталях, которые опять-таки могут оказаться функционально значимыми.

Сказанное иллюстрируют данные по мутантам хорошо изученного белка — лизоцима. У птиц отряда Galliformes в структуре лизоцимов яичного белка содержится неподалеку от активного центра кластер, который образован одним из двух наборов аминокислотных остатков:

Thr-40 ... Ile-55 ... Ser-91

или

Ser-40 ... Val-55 ... Thr-91

В этих позициях другие аминокислотные остатки не встречаются, более того, неизвестны и природные лизоцимы, которые отвечали бы переходным наборам аминокислотных остатков, например Ser-40, Ile-55, Ser-91 и т.п. Полученные методом направленного мутагенеза все возможные переходные формы оказались качественно весьма похожими на оба исходные варианта, в частности обнаруживали близкую удельную активность. Рентгеноструктурный анализ показал, что структура белковой глобулы достаточно пластична и может адаптировать небольшие изменения в строении боковых цепей. Так, при замене Ser-91 на Thr дополнительная метильная группа треонина частью заполняет имевшуюся в структуре "пустоту", частью использует пространство, высвобождающееся после вызванного этой заменой поворота боковой группы Ile-55 вокруг связи $C_{\alpha}-C_{\beta}$. Вместе с тем такие обобщенные характеристики устойчивости белковой глобулы, как температура тепловой денатурации или температурная стабильность активности, у переходных форм, как правило, не оказываются промежуточными, а выходят за пределы этих же характеристик у исходных ферментов. Таким образом, не вызывая драматических изменений в свойствах, замены аминокислот в указанных позициях не безразличны для функ-

циональных свойств фермента, и не могут рассматриваться как вполне "нейтральные".

Меру вырожденности стереохимического кода, связывающего первичную и третичную структуру белка, позволяют оценить опыты М.Пташне и сотрудников. Методами белковой инженерии был проведен обмен α -спиралями, узнающими ДНК, между двумя белками-репрессорами: *cro* и 434. Ниже сравниваются фрагменты, кодирующие гомологичные α -спиральные участки в этих белках:

cro Gln Gln Ser Ile Glu Gln Leu Glu Asn Gly Lys

 * * * * * *

434 Gln Gln Ser Ile Gln Leu Ile Glu Ala Gly Val

(звездочками отмечены идентичные остатки)

Замена указанного участка в репрессоре 434 на последовательность *cro*-репрессора дала устойчивый гибридный белок — репрессор*, функционально похожий на *cro*-репрессор. Таким образом, вполне удалась пересадка большого фрагмента — α -спирали — в структурно родственный, но далеко не идентичный белок, где эта α -спираль смогла, очевидно, установить нековалентные взаимодействия с оставшейся структурой репрессора 434. Этот результат хорошо подтверждает вырожденность соотношения между третичной и первичной структурами. Однако, казалось бы, симметричная операция — пересадка α -спирального фрагмента репрессора 434 в *cro*-репрессор — привела к нестабильному белку, не способному существовать в клетке. Выяснилось, что остаток лейцина, имеющийся в α -спирали *cro*-белка, мешает установлению ее контакта с остаточной структурой белка 434. Лишь после замены одного этого остатка на свойственный репрессору 434 изолейцин структура гибридного белка стабилизировалась, и он получил возможность существовать и функционировать. Эти данные, не отрицая вырожденности стереохимического кода, указывают на ее существенные ограничения.

Несмотря на то что код, определяющий соотношение между первичной и третичной структурами белка, не расшифрован, делаются попытки предсказания пространственной структуры белка по известной первичной структуре, а также решения обратной задачи — *подбора такой последовательности аминокислот, которая обеспечивала бы формирование третичной структуры заданного типа*. Такое решение получено пока для относительно простых структур. Удалось сконструировать аминокислотные последовательности, не существующие в

природе и не являющиеся близкими аналогами природных, которые тем не менее способны формировать компактную пространственную структуру заранее заданного типа. Иными словами, сделаны первые шаги к синтезу белков *de novo*.

Один из таких белков представляет собой пучок из четырех α -спиралей, соединенных петлями. По такому же типу образована пространственная структура природных миогемэритрина и цитохрома с'. Последовательность α -спиральных участков этого белка такова: Gly—Glu—Leu—Glu—Glu—Leu—Leu—Lys—Lys—Leu—Lys—Glu—Leu—Leu—Lys—Gly, а соединяющих их петель —Pro—Arg—Arg—. Распределение же участков вторичной структуры в пептидной цепи следующее: Met— α -спираль—петля— α -спираль—петля— α -спираль—петля— α -спираль—COOH.

Этот белок, ген которого был синтезирован и клонирован в бактериальных клетках, удалось выделить. Показано, что он достаточно устойчив, например для его разворачивания при комнатной температуре требуется 7М раствор солянокислого гуанидина.

Другой белок, полученный *de novo*, также представляют собой пучок α -спиралей, образованных последовательностями, содержащими только серин и лейцин. Он способен встраиваться в мембраны и формировать каналы, проводящие катионы через фосфолипидную бислойную мембрану. Таким образом, удалось создать заново структуру, обладающую хотя бы несложной функцией. Описан и синтезирован *de novo* β -структурный белок. Делаются попытки создания ферментов *de novo*.

ГЛАВА 7

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА

Четвертичной структурой называют размещение в пространстве взаимодействующих между собой субъединиц, образованных отдельными полипептидными цепями белка.

В формировании четвертичной структуры участвуют не пептидные цепи сами по себе, а глобулы, образованные каждой из этих цепей в отдельности. Таким образом, понятие четвертичной структуры относится к ансамблю глобул. Взаимодействие между последними достаточно сильно, так что ансамбль выступает как единая молекула, в то же время каждая из объединившихся глобул — субъединиц — сохраняет значительную автономию, как правило, выраженную гораздо ярче, чем автономия домена в рамках третичной структуры.

Известны, однако, случаи, когда два или несколько полипептидов составляют единую глобулу. Как правило, это является следствием

ограниченного протеолиза — локального расщепления на отдельные отрезки первоначально целостной полипептидной цепи, образовавшей глобулу по обычным правилам формирования третичной структуры. Такие белки, естественно, не следует относить к числу имеющих четвертичную структуру.

Примером может служить *инсулин*. Его мономер построен из двух пептидных цепей А и В, содержащих соответственно 21 и 30 аминокислотных остатков. Однако эти цепи образуют единую структуру, получающуюся после "вырезания" соединяющего их пептида С из молекулы проинсулина, поэтому нет оснований считать их субъединицами. Другой пример — *конканавалин А* (молекулярная масса 26 кДа). Этот растительный белок относится к лектинам и специфически связывается с углеводными компонентами на поверхности клеток. Очищенный конканавалин представляет собой смесь целых и поврежденных протеолизом молекул, причем в последних пептидная цепь расщеплена на два фрагмента с молекулярными массами 20 и 6 кДа. Понятно, что такие поврежденные молекулы по структурной организации не отличаются принципиально от неповрежденных и нет оснований приписывать им четвертичную структуру, несмотря на наличие двух пептидных цепей.

Следует еще раз подчеркнуть, что речь идет о белках, формирующих единую глобулу. В некоторых белках полипептидная цепь образует при свертывании несколько глобул (доменов), между которыми устанавливается система нековалентных взаимодействий. Последующее протеолитическое разрезание участков цепи, соединяющих домены между собой, делает их вполне автономными, переводит в ранг субъединиц, формирующих четвертичную структуру.

Иногда в литературе используют термин "агрегат" как синоним понятия "четвертичная структура", с чем трудно согласиться, поскольку последнее подразумевает весьма высокий уровень организации — объединение субъединиц в *молекулу*, стабилизированную системой нековалентных взаимодействий. Точно так же нет оснований классифицировать как четвертичную структуру надмолекулярные (например, мультиферментные) комплексы или протяженные структуры, такие, например, как оболочки фагов (рис. 7.1) или белковые кристаллические тела включения в некоторых бациллах, хотя в механизме их образования немало общего с формированием четвертичной структуры.

Четвертичная структура. — последний уровень в организации белковой молекулы, к тому же не обязательный — до половины известных белков ее не имеют. Граница между белками, имеющими четвертичную структуру и лишенными ее, не всегда вполне определена. Некоторые белки сравнительно легко диссоциируют на субъединицы уже в

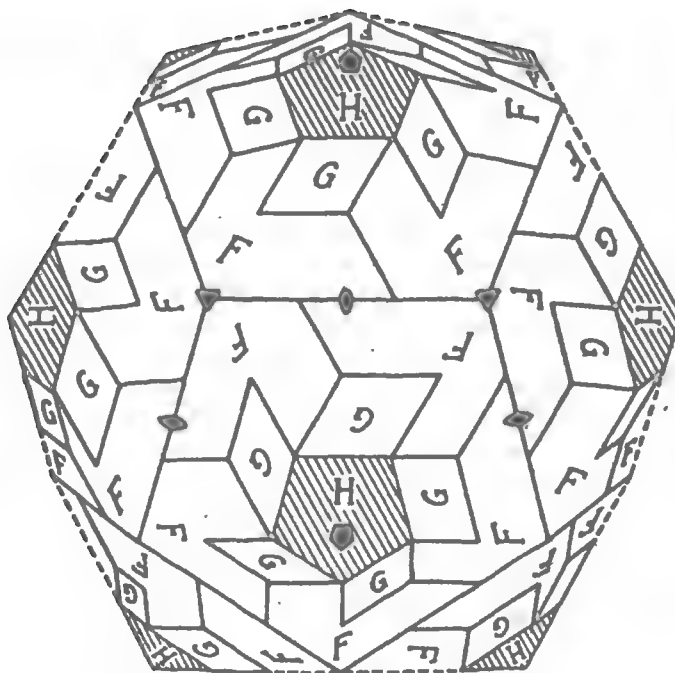


Рис. 7.1. Расположение белков (F, G, H), образующих оболочку капсида фага $\Phi \times 174$

Зачерненные пятиугольники соответствуют осям симметрии пятого порядка, треугольники – третьего порядка, "линзы" – второго порядка

обычных условиях. В то же время известно¹ возникновение более или менее стабильных димеров в растворах некоторых белков, которые не классифицируются как обладающие четвертичной структурой: такова, например, панкреатическая рибонуклеаза. Заметим, что поверхности белков, насыщенные функциональными группами и весьма неровные, склонны к образованию хотя бы слабой системы взаимодействий, на чем основана, в частности, кристаллизация белков. Такие взаимодействия следует, по-видимому, рассматривать как своеобразный зародыш, способный послужить в эволюции белка исходной точкой для развития достаточно совершенной четвертичной структуры.

7.1. СТЕХИОМЕТРИЯ И ГЕОМЕТРИЯ ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Субъединицы, образующие четвертичную структуру белка, могут быть совершенно различными как по строению, так и по функциональным свойствам. Такие белки относят к *гетеромерным*. Они встречаются довольно часто, позволяя объединить в одной структуре несколько взаимосвязанных функций, создать полифункциональную молекулу. К гетеромерам относится, например, протеинкиназа, в кото-

рой одна из субъединиц (С — каталитическая) ответственна за собственно ферментную активность и катализирует перенос фосфата АТР на белок, а другая является регуляторной (R). В отсутствие циклического АМР последняя связана с С-субъединицей в комплекс R—С и ингибирует ее. При образовании комплекса с сАМР четвертичная структура распадается и С-субъединица оказывается способной фосфорилировать белковые субстраты. Ярким примером гетеромерного белка может служить РНК-полимераза.

В гомомерных белках субъединицы одинаковы. С ними сходны и такие, строго говоря, гетеромерные белки, субъединицы которых не одинаковы, но достаточно сходны как по способу свертывания полипептидной цепи, так и функционально.

Частоты, с которыми встречаются белки, построенные из двух, трех, четырех и т.д. субъединиц, весьма различны. Так, для более или менее случайной выборки из примерно 200 белков с молекулярной массой не более 300 кДа оказалось димеров 102, тетрамеров 58, гексамеров 23, тогда как тримеров только 9, пентамеров ни одного, октамеров 3. Таким образом, подавляющая часть белков, имеющих четвертичную структуру, приходится на димеры, тетрамеры и гексамеры, причем последние встречаются у белков с молекулярной массой, большей 100 кДа.

Геометрия симметричных димеров очевидна. То же относится и к тримерам, которые весьма редки, однако встречаются. В частности, они могут играть существенную роль при образовании трансмембранных каналов, поскольку своего рода пучок из трех субъединиц сам по себе образует внутренний канал. В тетрамерных белках субъединицы могут размещаться в вершинах квадрата, что встречается редко, или же занимать вершины тетраэдра (рис. 7.2). Последний тип четвертичной структуры, в котором каждая субъединица взаимодействует с тремя остальными с различной силой, а молекула в целом оказывается весьма компактной, наблюдается особенно часто. Для гексамерных белков характерна октаэдрическая упаковка, гораздо реже встречаются плоские гексагональные структуры.

Субъединицы, образующие симметричную четвертичную структуру, бывают идентичными, но могут и отличаться, будучи в то же время однотипными, эволюционно родственными белками, которые обладают одинаковым способом свертывания пептидной цепи в пространстве. В этих случаях формирование четвертичной структуры имеет характерные особенности. Если, например, тетрамерный белок образован структурно гомологичными однотипными субъединицами α и β , то в зависимости от степени их отличия возможны две ситуации. В первом случае, когда контакты α — α , β — α и β — β отличаются существенно, образу-

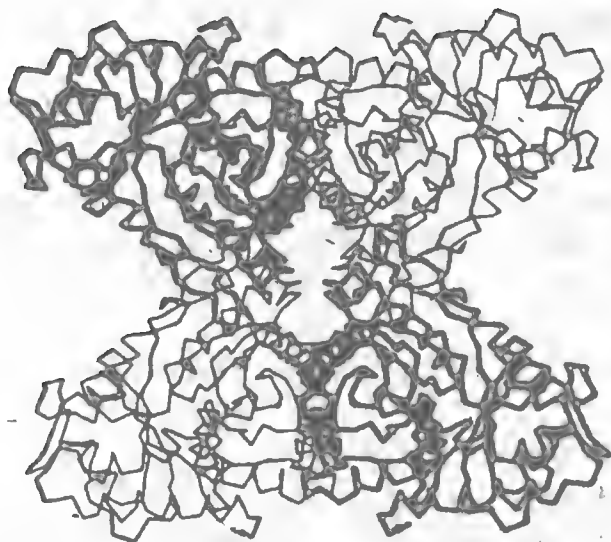


Рис. 7.2. Четвертичная структура альдолазы скелетных мышц кролика

Фермент состоит из четырех одинаковых субъединиц, расположенных в вершинах тетраэдра (две, выделенные жирными линиями, расположены ближе к читателю). Межсубъединичные взаимодействия в этом случае обеспечиваются гидрофобными контактами между боковыми радикалами аминокислот, образующих α -спирали

века, построенная из четырех субъединиц. Последние могут быть двух типов: М- (от англ. muscle — мышечная) субъединица, преобладающая в гладких мышцах, и Н- (от англ. heart — сердечная) субъединица, преимущественно синтезируемая в сердечной мышце. Для лактатдегидрогеназы возможен следующий набор множественных форм: М₄, М₃Н₁, М₂Н₂, МН₃, Н₄. Заметим, что множественные формы, различия между которыми обусловлены генетически, а не вызваны посттрансляционными модификациями или повреждением белка, принято называть *изоформами*. Разница в первичной структуре субъединиц отражается на соотношении катионных и анионных групп, что приводит к различиям в заряде изоформ и позволяет легко разделить их методом электрофореза. Такой анализ изоферментного состава лактатдегидрогеназы крови позволяет следить за поступлением в кровь лактатдегидрогеназы некоторых органов, в частности сердца при развитии соответствующей патологии, например при некрозе сердечной мышцы. В последнем случае возрастает содержание изоформ, обогащенных Н-субъединицей. Этот подход нашел применение в медицинской диагностике и биохимической генетике.

ется четвертичная структура типа $\alpha_2\beta_2$, другие же наборы субъединиц нестабильны и практически не обнаруживаются. Так, в частности, построены молекулы гемоглобинов. Если же межсубъединичные контакты практически равноценны, оказывается возможным образование набора всех возможных четвертичных структур, т.е. α_4 , $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_1\beta_3$ и β_4 , причем доля каждой из этих *множественных форм* (заметим, что это далеко не единственная причина появления множественных форм белков) определяется относительным содержанием субъединиц α и β .

Типичным примером является *лактатдегидрогеназа* чело-

7.2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ СУБЪЕДИНИЦАМИ, СТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ ЧЕТВЕРТИЧНУЮ СТРУКТУРУ

Межсубъединичные контакты, которые определяют существование четвертичной структуры, представляют собой весьма развитую систему нековалентных взаимодействий. Ковалентные дисульфидные связи весьма редко используются для стабилизации четвертичной структуры (например, они соединяют легкие и тяжелые цепи в иммуноглобулинах), причем даже в этих случаях они играют подчиненную роль, дополняя нековалентные контакты.

В организации сети межсубъединичных контактов важная роль принадлежит водородным связям. Очень часто система таких связей соединяет в одну очень протяженную структуру β -складчатые листы контактирующих субъединиц. Если на поверхность субъединицы выходит крайний отрезок β -складчатого листа, то такой же отрезок будет занимать соответствующее положение в другой субъединице. Поворот последней на 180° позволит сблизить упомянутые отрезки так, что между ними установится характерная для антипараллельной β -структуры система водородных связей. Например, в четвертичной структуре алкогольдегидрогеназы лошади, фермента, катализирующего превращение различных спиртов в альдегиды, две субъединицы, контактируя, образуют протяженный β -складчатый слой, который состоит из 12 пептидных отрезков. В зоне контакта в общей сложности устанавливается 8 водородных связей между $C=O$ - и $N-H$ -группами главной цепи:

Субъединица 1		Субъединица 2
Arg-312	$C=O \cdots \cdots H-N$	Gly-316
Trp-314	$C=O \cdots \cdots H-N$	Trp-314
Trp-314	$N-H \cdots \cdots O=C$	Trp-314
Gly-316	$N-H \cdots \cdots O=C$	Trp-312
Leu-301	$N-H \cdots \cdots O=C$	Met-303
Leu-301	$C=O \cdots \cdots H-N$	Met-303
Met-303	$N-H \cdots \cdots O=C$	Leu-301
Met-303	$C=O \cdots \cdots H-N$	Leu-301

В дополнение к этой системе могут возникать и отдельные водородные связи между функциональными группами разных субъединиц.

Как ни значима роль водородных связей, сами по себе они не смогли бы обеспечить поддержание достаточно устойчивой четвертичной структуры, особенно в водных растворах. Как и при образовании

третичной структуры, большое значение имеют при этом контакты между гидрофобными группами и целыми гидрофобными участками на поверхности взаимодействующих субъединиц. Уже упоминалось, что около половины гидрофобных аминокислотных остатков локализовано в поверхностном слое белка, поэтому возникновение таких контактов вполне объяснимо. Так, четвертичная структура алкогольдегидрогеназы кроме водородных связей стабилизируется гидрофобными контактами, в которых со стороны каждой из двух субъединиц участвуют два остатка метионина, один — лейцина, три — изолейцина, два — пролина, один — триптофана, в общей сложности 18 остатков, размещенных на площади $600 \text{ \AA}^2$. Гидрофобные боковые группы этих остатков в изолированной субъединице имели бы термодинамически невыгодные контакты с водой, упорядочивая ее структуру. Поэтому формирование межсубъединичного контакта приводит к возрастанию энтропии системы, и равновесие оказывается сдвинутым в сторону олигомера.

Сочетание системы водородных связей и гидрофобных контактов делает очень прочным связывание субъединиц алкогольдегидрогеназы. Диссоциация четвертичной структуры этого белка достигается только в 8 М мочеvine.

Межсубъединичные контакты нередко содержат ионные пары, в которых устанавливаются электростатические взаимодействия между противоположно заряженными функциональными группами субъединиц, например между карбоксилат-ионами остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот и катионными группами боковых цепей лизина или аргинина. При этом вовсе не обязательно образование только ионных пар — нередко возникают целые системы, кластеры пространственно сближенных разноименных зарядов. Исключение воды из межсубъединичного контакта делает такие взаимодействия, не слишком устойчивые на поверхности белка, весьма значимыми.

Анализ четвертичной структуры нескольких белков показал, что среди аминокислотных остатков, обеспечивающих межсубъединичные контакты, 67% являются неполярными, 20 — полярными, 13% несут заряженные группы.

В целом зона контакта между субъединицами представляет собой кооперативную систему нековалентных взаимодействий, стабильность которой существенно зависит от внешних условий и, что особенно важно, даже от небольших изменений в пространственной структуре каждой из взаимодействующих субъединиц. Здесь кроется молекулярный базис одной из наиболее специфичных функций четвертичной структуры — ее способности передавать структурные перестройки одной субъединицы на другие.

Прочность четвертичной структуры может колебаться в широких пределах. Ее иногда измеряют долей поверхности субъединиц, которая участвует в межсубъединичном контакте и оказывается скрытой от воды при формировании структуры.

Заметим, что стабилизация четвертичной структуры обусловлена качественно теми же нековалентными взаимодействиями, от которых зависит и устойчивость третичной структуры, хотя вклад гидрофобных контактов несколько меньше. Различие носит скорее количественный характер: как правило, *третичная структура значительно прочнее четвертичной*, поэтому при воздействии факторов, нарушающих отмеченные связи, четвертичная структура обычно утрачивается первой, диссоциируя на сохранившие нативность субъединицы. Это правило имеет исключения, важно, однако, что относительно меньшая стабильность четвертичной структуры дает большие преимущества при использовании ее изменений как факторов регуляции функциональных свойств белков.

7.3. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КОНТАКТОВ МЕЖДУ СУБЪЕДИНИЦАМИ

Известно несколько типов организации межсубъединичных взаимодействий, которые характеризуются различной ролью элементов вторичной структуры в формировании контакта. Выше, на примере алькогольдегидрогеназы, был подробно рассмотрен довольно часто встречающийся способ, основанный на *взаимодействии между собой β -структурных* отрезков, которые расположены на периферии соседствующих субъединиц. Это приводит к формированию весьма протяженного β -складчатого слоя. Межсубъединичные контакты могут образовываться и за счет взаимодействия между функциональными группами, которые размещены на поверхности β -складчатых слоев.

Распространены и другие способы образования четвертичной структуры. Так, в цитоплазматической *малатдегидрогеназе* димер удерживается в основном *нековалентными взаимодействиями* внутри пучка шести параллельных α -спиралей — по три из каждой субъединицы. Понятно, что при этом главная роль принадлежит боковым группам аминокислотных остатков, соответственно расположенных в α -спиралях. В четвертичной структуре некоторых белков, например триозофосфатизомеразы, главная роль принадлежит *пептидным петлям*, участвующим в установлении нековалентных взаимодействий между субъединицами.

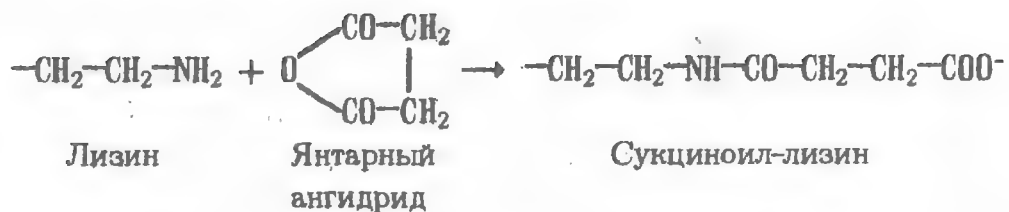
Особенно характерны белки, которые несут специализированные

структуры, позволяющие *обратимо* устанавливать или расщеплять межсубъединичные контакты, так называемые *лейциновые молнии*. В таких белках (к ним, в частности, принадлежит целое семейство регуляторов транскрипции) имеется характерная последовательность, в которой каждое седьмое положение занимает остаток гидрофобной аминокислоты, чаще всего лейцина. При образовании этой последовательностью α -спирали разветвленные гидрофобные группы остатков лейцина образуют своеобразный "редкий" гребень, будучи разделены двумя оборотами α -спирали. (Напомним, что ее периодичность — 3,6 остатка.) Две такие спирали, принадлежащие разным субъединицам и направленные одинаково, свертываются в двойную суперспираль (ср. разд. 14.3). Последняя стабилизируется гидрофобными контактами между остатками лейцина, выстраивающимися в плотный гребень. Такой процесс действительно напоминает застегивание "молнии".

7.4. СПОСОБЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Наибольшую информацию о четвертичной структуре белка дает метод рентгеноструктурного анализа, однако он применим, как правило, на завершающих этапах исследования. Между тем хотя бы приближенные сведения об этом уровне организации необходимы с самого начала. Соответственно особое значение имеют *способы легкой диссоциации четвертичной структуры*, позволяющие выделить субъединицы или какие-то промежуточные структуры в нативном состоянии. Общего решения такой задачи нет, так как прочность четвертичной структуры может быть весьма различной. Однако представления о характере сил, которые обуславливают стабильность четвертичной структуры, помогают в поиске условий, благоприятствующих диссоциации межсубъединичных контактов.

Так, молекула гемоглобина, образованная из четырех субъединиц и имеющая формулу $\alpha_2\beta_2$, уже в 0,5 М NaCl диссоциирует на димеры по схеме $\alpha_2\beta_2 \longrightarrow 2\alpha\beta$, что указывает на весьма слабые связи между одноименными субъединицами. В других случаях удается добиться диссоциации четвертичной структуры в присутствии умеренных концентраций мочевины или солянокислого гуанидина — реагентов, вызывающих расщепление межсубъединичных водородных связей, а также гидрофобных контактов. Довольно хорошие результаты дает исчерпывающая модификация аминогрупп лизина *ангидридами дикарбоновых кислот*, например янтарным ангидридом:



В результате такой реакции, затрагивающей практически только ε-аминные группы остатков лизина, которые в нормальных условиях полностью протонированы и несут положительный заряд, последние заменяются отрицательно заряженными карбоксилат-ионами сукциноильных группировок. Происходит резкое изменение поверхностного заряда белковой глобулы (в данном случае субъединицы). Появление на контактирующих поверхностях субъединиц одноименных отрицательно заряженных групп резко ослабляет взаимодействие между ними и приводит к диссоциации четвертичной структуры. Определение молекулярной массы диссоциированных субъединиц, как и исходного белка, проводят методом седиментационного анализа или чаще гель-фильтрацией.

. Впрочем, при первичной характеристике белка обычно прибегают к жесткой денатурации молекулы, разрушению в ней всех нековалентных взаимодействий, что вызывает, естественно, и полную утрату четвертичной структуры. Излюбленный прием состоит в обработке белка анионным детергентом — додецилсульфатом натрия. Как уже отмечалось в разд. 6.10, этот детергент прочно связывается с гидрофобными элементами полипептидной цепи и вызывает ее полное разворачивание в палочковидную структуру, заряженную отрицательно, причем количество связавшегося додецилсульфата в расчете на единицу длины полипептидной цепи, а значит, и плотность отрицательного заряда весьма постоянны. Ввиду этого электрофоретическая подвижность таких комплексов зависит только от длины цепи, что дает возможность выяснить, состоит ли изучаемый белок из одного или нескольких видов субъединиц, отличающихся по молекулярной массе. Сравнение же электрофоретических подвижностей субъединиц и набора стандартных белков с известными молекулярными массами позволяет определить и молекулярные массы субъединиц.

Заметим, что проведение электрофореза комплексов белок — додецилсульфат в свободном растворе невозможно, так как зоны разделяемых компонентов будут перемешиваться из-за неизбежной конвекции. Чтобы снизить этот эффект, электрофорез проводят в гелях полиакриламида, поперечносшитого метилен-бисакриламидом. Полимерная сетка, плотность которой определяется концентрацией взятого для приготовления геля акриламида и сшивающего компонента, соз-

дает препятствия для перемещения к аноду отрицательно заряженных комплексов тем большие, чем больше длина пептидной цепи. Регулируя плотность геля, можно подобрать оптимальные условия для определения той или иной величины молекулярной массы. Точность метода вполне удовлетворительна для анализа четвертичной структуры.

Для определения *стехиометрии* четвертичной структуры требуется знать, из скольких видов субъединиц построен белок и какова их молекулярная масса. Если при этом известна молекулярная масса нативного белка, можно сделать определенные предположения о его четвертичной структуре. Несколько сложнее обстоит дело при изучении белков, имеющих разные субъединицы одинаковой или очень близкой молекулярной массы. В таких случаях используют определение N-концевых аминокислот или последовательностей, которые могут оказаться характерными для каждой из субъединиц, или же прибегают к поиску способа диссоциации белка на субъединицы, сохранившие третичную структуру, что позволяет разделить их каким-либо из хроматографических методов.

7.5. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА

Подробный анализ функциональной роли четвертичной структуры может быть дан только на примере конкретных белков, что выходит за рамки данной главы. Мы остановимся поэтому только на некоторых принципиальных положениях. Нередко утверждалось, что построение крупных белковых молекул из не очень длинных пептидных цепей, образующих четвертичную структуру, позволяет снизить опасность ошибок трансляции. Действительно, даже одна ошибка в биосинтезе достаточно длинной полипептидной цепи, состоящей, например, из 1000 аминокислотных остатков, может дестабилизировать его структуру и сделать весь синтез бессмысленным. В том случае, если белок такого же размера был бы построен, например, из четырех субъединиц по 250 аминокислотных остатков каждая, такая же ошибка вызовет потерю только одной субъединицы.

Эти соображения, видимо, несправедливы, поскольку, как выяснилось в последнее время, многие белки синтезируются в виде очень длинных (по несколько тысяч аминокислотных остатков) предшественников, так называемых *полибелков*, в дальнейшем нарезаемых на функциональные глобулы. Следовательно, ошибки трансляции не накладывают серьезных ограничений на размер пептидной цепи, по-

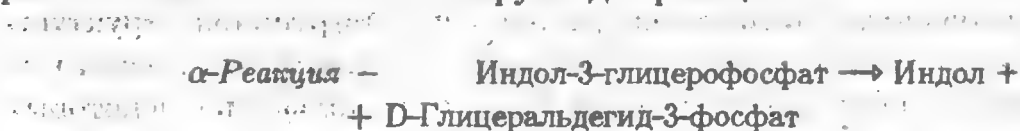
этому трудно представить, чтобы четвертичная структура развилась как способ защиты от них.

Можно предположить, что четвертичная структура способна выполнять одну или несколько следующих функций.

1. **Объединение нескольких взаимосвязанных функций в единой структуре.** Эта особенность четвертичной структуры лежит в основе пространственной организации, совмещения в единой структуре нескольких функционально активных центров, каждый из которых размещается на отдельной субъединице — такова, например, РНК-полимераза. Иногда по сходным принципам, но гораздо более сложно, организуются очень крупные полиферментные комплексы.

2. **Архитектурная функция.** Четвертичная структура позволяет формировать из сравнительно небольших глобулярных субъединиц пространственные образования весьма сложной конфигурации, обеспечивающие специфические функциональные возможности белка.

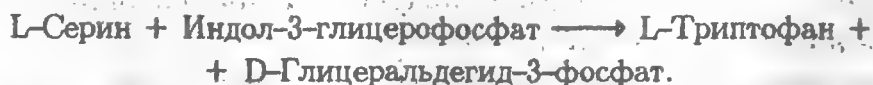
Так, у ферритина (белок животных) молекула построена из 24 субъединиц, окружающих большую внутреннюю полость. Эта полость предназначена для хранения оксида железа — в ней размещается до 3500 группировок FeO.OH (рис. 7.3). Еще один пример такой же функции — формирование двумя субъединицами небольшого белка утероглобина полости размером $15 \times 7 \times 8 \text{ \AA}$, которая служит для связывания стероидного гормона — прогестерона. Субъединицы фермента триптофансинтазы *E.coli* катализируют две реакции:



обеспечивается α -субъединицей



— димером β -субъединиц. Объединение этих субъединиц в четвертичную структуру $\alpha_2\beta_2$ открывает возможность проводить суммарную α, β -реакцию:



Существенно, что продукт первой реакции — индол — служит субстратом второй, которая протекает с участием другого каталитического центра. Четвертичная структура этого фермента, который можно рассматривать как прообраз полиферментных комплексов, построена так, что субъединицы образуют своего рода туннель, по которому индол

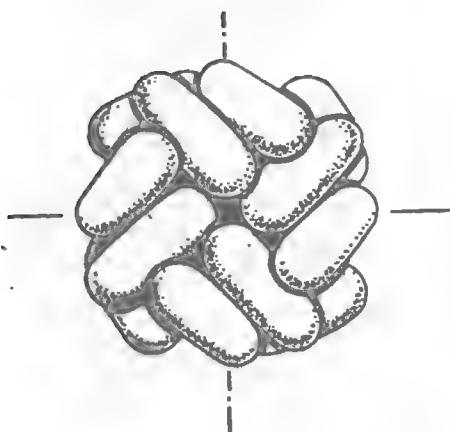


Рис. 7.3. Четвертичная структура ферритина

Ферритин — гетерополимерный белок, построенный из 24 структурно близких легкой и тяжелой субъединиц. Молекула представляет собой полую сферическую оболочку, пронизанную каналами, через которые внутрь поступают ионы железа. По-видимому, субъединицы в ходе формирования четвертичной структуры последовательно объединяются в димеры, тетрамеры, гексамеры, октамеры

перемещается от одного центра к другому, не переходя в раствор. Этим обеспечивается высокая эффективность суммарного процесса, приводящего к синтезу триптофана. Очевидно, что в рассмотренном случае реализуется и принцип объединения функций в единой структуре.

По-видимому, некоторые белки, которые соединяют в единой структуре две взаимосвязанные функции, могли проходить в своей эволюции стадию формирования четвертичной структуры из двух самостоятельных субъединиц. В дальнейшем произошло слияние их структурных генов и, следовательно, объединение полипептидных цепей в одну. В результате, как можно предполагать, субъединицы как бы перешли в ранг доменов в единой молекуле.

Заложенные в четвертичной структуре возможности используются и при создании функциональных центров белков.

Так, активные центры ряда дегидрогеназ формируются аминокислотными остатками, расположенными на разных субъединицах этих ферментов. Это позволяет организовать активный центр, охватывающий субстрат со многих сторон, изолировать его от воды. Например, в алкогольдегидрогеназе лошади "карман", в котором находится активный центр, образован боковыми цепями аминокислот, принадлежащих двум одинаковым субъединицам. Субъединица 1 дает для этого три остатка лейцина, по два — серина и фенилаланина, по одному — валина, изолейцина, пролина и треонина. Субъединица 2 — остатки метионина, лейцина и серина.

В триозофосфатизомеразе зона связывания субстрата также образована двумя субъединицами, которые при взаимодействии с фосфатной группой субстрата сближаются, закрывая его от окружающего растворителя, так что реакция протекает при полном его отсутствии. Центр связывания антигена иммуноглобулином образован аминокислотными остатками, расположенными на двух полипептидных цепях — легкой и тяжелой — иммуноглобулина.

3. Обеспечение множественных взаимодействий белка с протяженными структурами. За счет образования четвертичной структуры два

или несколько функциональных центров белка могут объединяться в одном крупном образовании и устанавливать кооперативное взаимодействие с какими-либо протяженными биологическими молекулами. Например, за счет существования четвертичной структуры иммуноглобулины типа G объединяют в одной молекуле два идентичных центра связывания антигена, позволяя в то же время в известных пределах изменять расстояние между ними за счет конформационной гибкости. Кооперативность взаимодействия таких антигенсвязывающих центров с макромолекулярными антигенами, например бактериальными стенками, делает комплексы антиген-иммуноглобулин гораздо более прочными, чем это наблюдалось бы для мономерного белка.

Не менее важно существование большого семейства ДНК-связывающих белков в виде димеров, содержащих опять-таки два идентичных участка связывания. Такие белки, как следствие, способны прочно связываться с повторяющимися последовательностями в двух цепях двуспиральной ДНК. По такому принципу построены по крайней мере некоторые белки-репрессоры, в частности *σ*-репрессор фага λ. Для нескольких семейств белков, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами, возможно, по-видимому, образование димеров из одинаковых (гомодимеры) и разных (гетеродимеры) субъединиц. Понятно, что функциональная роль гомо- и гетеродимеров существенно отличается, так как оказывается различной зона белка, способная связываться с соответствующим участком ДНК. Следовательно, само образование четвертичной структуры регулирует функцию таких белков.

4. Регуляторная функция. Главная функциональная особенность четвертичной структуры, по-видимому, смысл ее существования, состоит в том, что *относительно слабые взаимодействия между субъединицами*, характер которых существенно зависит от третичной структуры каждой из них, особенно удобны для регуляторных воздействий, *управления активностью белков*. Ввиду относительной слабости межсубъединичных контактов изменения в третичной структуре какой-либо субъединицы, вызванные ее взаимодействием с субстратом или иным лигандом, передаются на зону ее контакта с другой субъединицей, изменяя характер этой зоны. Такое изменение приводит к перестройке всей четвертичной структуры и обеспечивает передачу эффекта от одной субъединицы к другим, объединенным в ее рамках (см., например, гл. 8 и 12).

Зона контакта между субъединицами, будучи относительно слабым элементом белковой структуры, легко воспринимает и изменения, происходящие при посттрансляционной модификации белка, например при включении или отщеплении фосфатного остатка (см. гл. 11), что опять-таки используется как регуляторный механизм.

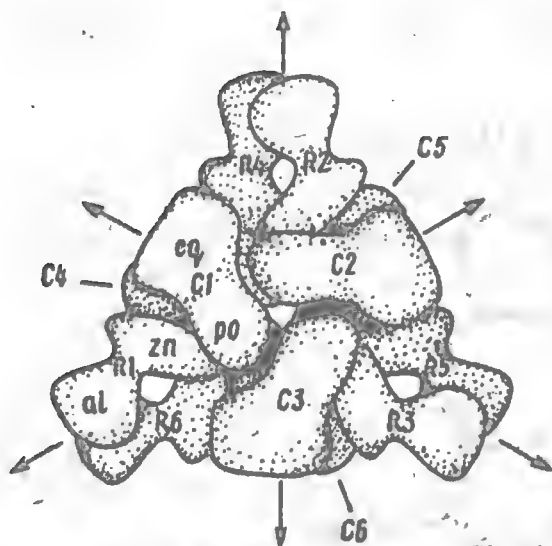


Рис. 7.4. Четвертичная структура аспартаткарбамилтрансферазы *E. coli*

C1-C6 - каталитические субъединицы, образующие два тримера C1-C3 и C4-C6; R1-R2, R3-R4, и R5-R6 - димеры регуляторных субъединиц; eg, po, zn и al - домены, из которых построены эти субъединицы; стрелками показаны оси симметрии

конформации регуляторных субъединиц, которое через перестройку четвертичной структуры передается на каталитические субъединицы. Стехиометрия четвертичной структуры фермента отвечает формуле $(C_3)_2(R_2)_3$.

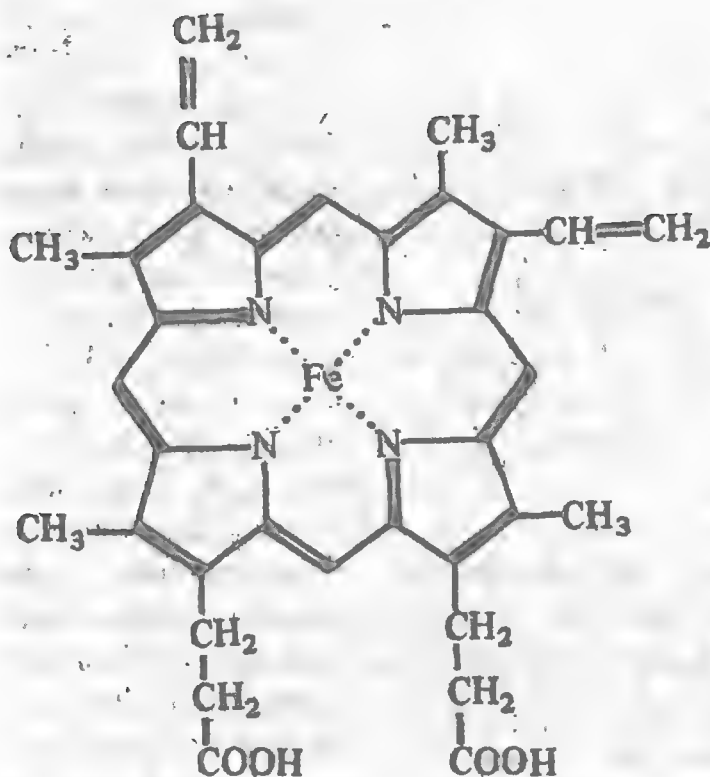
Примером белка, четвертичная структура которого обеспечивает очень сложную регуляцию, будучи и сама весьма непростой, является аспартаткарбамилтрансфераза *E. coli* (рис. 7.4). В этом ферменте, ключевом в биосинтезе пиримидинов, шесть каталитических субъединиц C объединяются в два тримера, которые в ответ на присоединение субстратов могут в большей или меньшей степени взаимодействовать между собой. Регуляторные субъединицы R образуют три димера, имеющие контакт с каталитическими субъединицами. Это позволяет ингибировать фермент СТР (конечным продуктом пути биосинтеза пиримидинов) и активировать его АТР, видимо, за счет изменения

ГЛАВА 8

ГЛОБИНЫ

Глобины — семейство эволюционно родственных белков, которые способны обратимо связывать кислород и обеспечивают его хранение и транспорт в биологических системах.

Глобины широко распространены в мире животных. Легглобин — белок, содержащийся в клубеньках бобовых растений, — также относится к глобинам. Глобины принадлежат к так называемым сложным белкам и содержат характерный небелковый компонент (простетическую группу) — $гем$, представляющий собой комплекс двухвалентного железа и порфирина:



Гем

Гем играет ключевую роль в функционировании глобинов, так как именно к нему, точнее — к включенному в его структуру иону двухвалентного железа, присоединяется молекула кислорода.

Особенность глобинов состоит в том, что в норме связывание молекулы кислорода не вызывает окисления железа до трехвалентного. Функциональный смысл этой особенности понятен — окисление привело бы к расходованию кислорода и сделало бы невозможным его транспорт и хранение. Таким образом, при анализе строения этих белков следует уделить главное внимание способу связывания кислорода и молекулярным механизмам, которые позволяют управлять его присоединением и отщеплением.

Существует два главных типа глобинов: *миоглобин*, содержащийся в мышцах и обеспечивающий хранение кислорода, и *гемоглобин* — белок, сосредоточенный в эритроцитах и ответственный за перенос кровью кислорода от легких к тканям. Изучение строения и функциональных черт глобинов, в котором особо важная роль принадлежит рентгеноструктурным исследованиям М.Перутца, Дж.Кендрыю и их сотрудников, оказало большое влияние на формирование современных представлений о структуре, функции и эволюции белков.

Миоглобин и субъединицы гемоглобина имеют очень близкую третичную структуру, их пептидные цепи свернуты в пространстве сходным образом. Вполне определенное, хотя и заметно меньшее, сходство обнаруживают и их первичные структуры. В то же время миоглобин лишен четвертичной структуры и его функция ограничивается только хранением кислорода. Таким образом, миоглобин — более простой белок, более древний, чем гемоглобин.

Пептидная цепь миоглобина млекопитающих состоит из 153 аминокислотных остатков. Сравнение первичных структур миоглобинов 24 видов животных показывает, что 82 положения во всех этих белках занимают одни и те же аминокислоты. Следовательно, примерно половина остатков в указанной выборке миоглобинов неизменна, инвариантна, другие же остатки могут заменяться, что, однако, практически не отражается на укладке полипептидной цепи, ее третичной структуре. Впрочем, многие из замен не изменяют существенным образом химической природы данного остатка — гидрофильные аминокислоты заменяются гидрофильными, гидрофобные — гидрофобными, т.е. наблюдаются по преимуществу так называемые консервативные замены.

Миоглобин, как и другие глобины, — четко выраженный α -спиральный белок (рис. 8.1). Его пространственная структура образована восемью α -спиралями, последовательно обозначаемыми буквами от А до Н (от аминного к карбоксильному концу цепи). В α -спиралях содержится 75% всех аминокислотных остатков, остальные приходятся на повороты и неупорядоченные концевые остатки пептидной цепи. Неспиральные участки обозначают двумя буквами, соответствующими спиралям, между которыми расположен поворот, или спирали и аминному (N) либо карбоксильному (C) концу пептидной цепи. Например, HC соответствует участку между последней спиралью H и C-концевой аминокислотой. Для аминокислотных остатков миоглобина принято указывать буквенное обозначение α -спирали, в которой данный остаток находится, и его порядковый номер в ней.

Около 30 аминокислотных остатков, точнее — их боковые цепи, образуют внутреннее гидрофобное ядро миоглобина, стабилизирующее его пространственную структуру. Ядро, в котором можно выделить три сегмента, или "кластера", содержит остатки валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина и аланина. Упаковка боковых цепей этих аминокислот в кластерах достаточно плотна и в то же время допускает определенную свободу их движения друг относительно друга. В одном из кластеров есть впадина, достаточная, например, для размещения атома

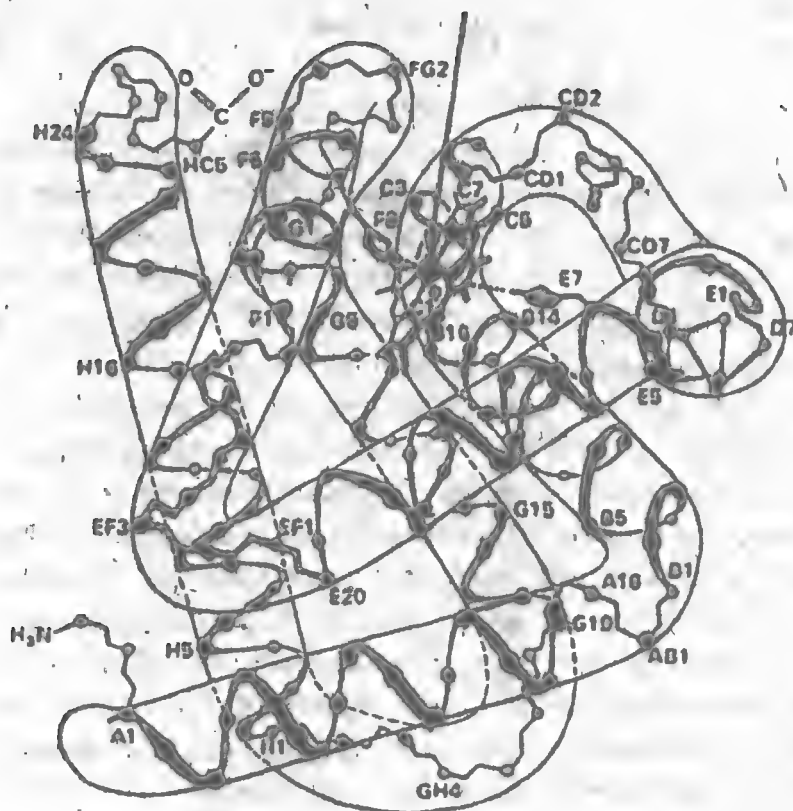


Рис. 8.1. Пространственная структура миоглобина

Показаны только C_{α} -атомы. Между спиралью E и F расположен гем (указан стрелкой). Близкую структуру имеют субъединицы гемоглобина

ксенона. Кластеры объединяет в гидрофобное ядро планарная молекула гема, как бы вставленная внутрь структуры миоглобина.

При этом с водой контактирует только ребро молекулы гема, погруженной в блок, как в своего рода корзинку, образованную двумя α -спиралями (E и F) и выстланную гидрофобными боковыми цепями аминокислот. Гем не имеет ковалентных связей с белком, удерживался нековалентными взаимодействиями. Всего насчитывается 80 межмолекулярных контактов между белком и гемом, что обеспечивает достаточно прочное удерживание последнего.

С обеих сторон плоскости гема, "над" и "под" атомом железа, располагаются имидазольные кольца двух остатков гистидина (рис. 8.2). Один из них, занимающий восьмое положение в α -спирали F (H18 F8) и наиболее приближенный к атому железа, называют проксимальным. Атом азота его имидазольного кольца находится в контакте с атомом железа, так что можно думать об образовании между ними ковалентной связи. Другой остаток гистидина, занимающий седьмое

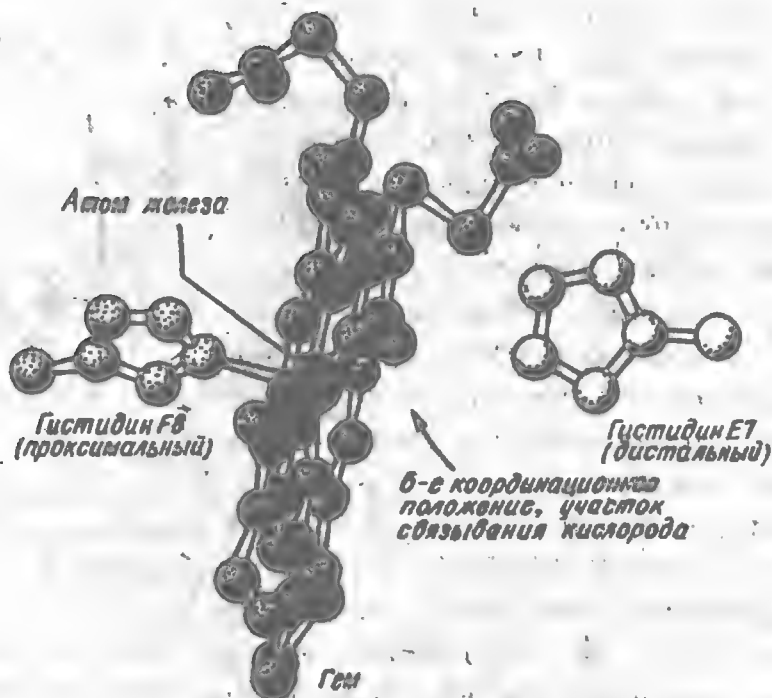


Рис. 8.2. Зона присоединения кислорода в миоглобине и субъединицах гемоглобинов

Находящийся в центре порфирина атом железа (Fe^{2+}) связан с атомом азота имидазольного кольца проксимального гистидина F8. Молекула кислорода располагается при связывании между группой N-H имидазольного кольца дистального гистидина E7 и атомом железа под углом к плоскости гема.

положение в α -спирали E (His E7), называют *дистальными*, так как он относительно удален от атома железа. Между последним и имидазольной группой этого остатка есть свободное пространство, в котором и размещается связываемая миоглобином молекула кислорода, причем один из ее атомов непосредственно подходит к железу, другой — к имидазолу His E7. Замена дистального гистидина глицином ухудшает связывание кислорода в 1000 раз.

В миоглобине некоторых моллюсков положение E7 занято не гистидином, а валином, что также приводит к значительному понижению сродства к кислороду. Очевидно, что водородная связь, образуемая имидазольной группой дистального гистидина с кислородом, способствует связыванию последнего. Таким образом, вокруг двухвалентного железа гема пять координационных мест заняты атомами азота (четыре из них принадлежат порфирину, пятый — His F8), одно — кислородом.

Пространство, в котором связывается молекула кислорода, не име-

ет, однако, постоянного выхода в окружающую миоглобин воду. Предполагают, что боковые группы остатка His E7 и соседнего с ним Arg CD3 могут занимать несколько разных положений, образуя своего рода "дверцу". Ее открытие позволяет молекуле кислорода подойти к гему. Неясно, "дожидается" ли кислород случайного открывания "дверцы" в результате тепловых колебаний или как-то его индуцирует. Очевидно, что динамика молекулы миоглобина играет существенную роль в его функции.

Напомним, что в нормальных условиях в миоглобине и других глобинах при присоединении кислорода окисления железа не наблюдается. Судя по модельным опытам, это как-то связано с погружением комплекса гем—кислород в гидрофобную среду, каковой является окружение гема в глобинах. Если все же окисление происходит и железо переходит в трехвалентное состояние, то образуется так называемый *феррицианоглобин*, уже не способный функционировать. Место связывания кислорода в нем занято водой. Заметим, что ту же впадину между атомом железа и дистальным гистидином могут занимать и другие молекулы. Например, CO связывается с гемом примерно в 200 раз прочнее кислорода, лишая глобин возможности функционировать.

Кислород легко связывается миоглобином — полное насыщение белка достигается уже при парциальном давлении около 10 мм рт.ст., а 50%-ное — при 1 мм рт.ст.¹ (рис. 8.3). Таким образом, миоглобин хорошо приспособлен к хранению кислорода в мышцах, насыщаясь им уже при весьма низких парциальных давлениях, характерных для тканей. Однако он не мог бы обеспечить транспортной функции: насытившись кислородом в легких, он с трудом отдавал бы его в капиллярах. Эту задачу решает родственный миоглобину, но построенный более сложно белок — гемоглобин.

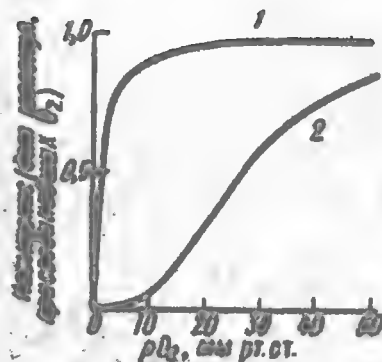


Рис. 8.3. Кривые зависимости степени насыщения кислородом миоглобина (1) и гемоглобина (2) в зависимости от парциального давления кислорода.

8.2. ГЕМОГЛОБИН

Все гемоглобины млекопитающих имеют четвертичную структуру и состоят из четырех субъединиц. Практически всегда это две пары одинаковых субъединиц, так что гемоглобины стехиометрически могут

¹ 1 мм рт.ст. = 1,3 гПа.

быть представлены формулами вида $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_2\gamma_2$, $\alpha_2\delta_2$ и т.д. Пептидные цепи, соответствующие субъединицам гемоглобинов, обнаруживают сходство первичных структур, являются *гомологичными*. Так, при сравнении первичных структур α - и β -цепей гемоглобина А человека, которые состоят соответственно из 141 и 147 аминокислот, совпадает около половины остатков. Гомология выявляется и при сравнении последовательностей гемоглобинов и миоглобинов, хотя она менее выражена.

В то же время *третичная структура* и способ укладки полипептидных цепей в пространстве у миоглобинов и субъединиц гемоглобинов весьма близки, что отражает их эволюционное родство, происхождение от одного предшественника. Таким образом, субъединицы гемоглобина построены почти так же, как описанная выше молекула миоглобина: α -субъединица образована семью, β — восемью α -спиралями. Присоединение молекулы кислорода к субъединицам гемоглобина, каждая из которых содержит гем, в первом приближении протекает так же, как и при насыщении миоглобина.

Главное различие функциональных свойств миоглобина и гемоглобина состоит в том, что четвертичная структура сообщает молекуле гемоглобина способность *регулировать присоединение и отщепление кислорода*, придает ей кооперативные свойства, которых лишен миоглобин. С учетом этого дальнейшее рассмотрение свойств гемоглобина будет посвящено анализу четвертичной структуры этого белка и ее функциональной роли.

8.2.1. Четвертичная структура гемоглобина

В четвертичной структуре гемоглобина субъединицы образуют *тетрадр*, стабилизированный межсубъединичными контактами — системой нековалентных связей. Эти контакты, на которые приходится в общей сложности примерно $1/5$ всей поверхности четырех субъединиц, весьма различны по числу нековалентных взаимодействий и, следовательно, по прочности (рис. 8.4). Наиболее развит и наиболее устойчив контакт между α -субъединицей и одной из β -субъединиц — так называемый *контакт $\alpha 1 - \beta 1$* . В его образовании участвует 34 аминокислотных остатка, 110 атомов сближены в нем на расстояние, меньшее 4 Å. Если принять общую площадь межсубъединичных контактов за 100%, то на контакт $\alpha 1 - \beta 1$ и идентичный ему $\alpha 2 - \beta 2$ придется 60%, что отвечает весьма сложной сети по преимуществу гидрофобных взаимодействий и нескольких водородных связей. Контакт той же $\alpha 1$ -субъединицы с другой β -субъединицей, так называемый *контакт $\alpha 1 - \beta 2$* , выглядит иначе, так как его образуют другие участ-

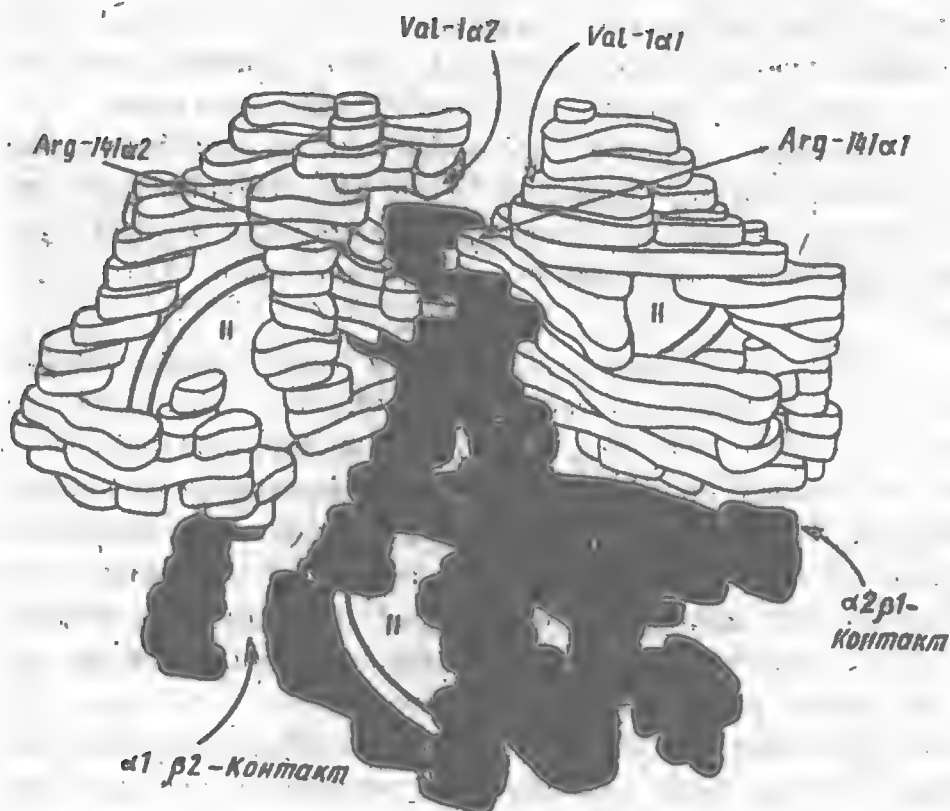


Рис. 8.4. Модель четвертичной структуры гемоглобина

Диски, помеченные буквой H, — гемы. Видны контакты α 1 β 2 и α 2 β 1. Показано, что слабый контакт α 1 α 2 зависит от взаимодействия N-концевых остатков валина и C-концевых — аргинина

ки поверхности глобул. В его формировании участвует 19 остатков аминокислот, образующих гидрофобные контакты и водородные связи. На его долю (вместе с таким же контактом α 2 — β 1) приходится 33% общей поверхности межсубъединичных контактов. Как следствие, он значительно слабее контакта α 1 — β 1.

Еще слабее контакты между одноименными субъединицами α 1 — α 2 и β 1 — β 2, которые представлены немногими, преимущественно поперечными, взаимодействиями. На них приходится около 7% общей поверхности контактов, стабилизирующих четвертичную структуру. Таким образом, два контакта, т.е. α 1 — β 1 и α 2 — β 2, доминируют в структуре молекулы гемоглобина. В определенных условиях, например в 2M NaCl, гемоглобин диссоциирует на димеры α — β , сохраняющиеся благодаря прочному контакту α 1 — β 1. Практически четвертичная структура гемоглобина как бы образована двумя относительно жестко связанными димерами α — β , которые удерживаются вместе более слабыми взаимодействиями (димер димеров).

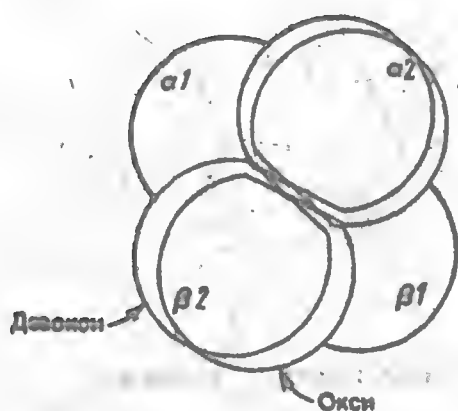


Рис. 8.5. Поворот и смещение $\alpha\beta$ -димеров в четвертичной структуре гемоглобина друг относительно друга при переходе белка из дезокси- в оксиформу

Поворот составляет примерно 15° , смещение — $0,8 \text{ \AA}$. Димеры фиксируются в новой позиции за счет изменений контакта $\alpha 1\beta 2$ (см. рис. 8.9)

В определенных условиях взаиморасположение димеров может изменяться за счет изменения характера менее прочных контактов $\alpha 1 - \beta 2$ и особенно $\alpha 1 - \alpha 2$ и $\beta 1 - \beta 2$. Не следует думать, что слабые контакты между субъединицами, не слишком значимые для поддержания целостности молекулы, не важны функционально. Наоборот, именно сочетание слабых и сильных взаимодействий обуславливает кооперативность четвертичной структуры гемоглобина, что, по-видимому, характерно и для многих других белков, обладающих этим уровнем организации.

Как показал рентгеноструктурный анализ, четвертичная структура молекулы гемоглобина может находиться в одном из двух состояний, отличающихся поворотом димеров $\alpha - \beta$ друг относительно друга (рис. 8.5). Одно из них устойчиво, если субъединицы насыщены кислородом и молекула гемоглобина содержит четыре молекулы кислорода, — оксигемоглобин. Другое стабильно, если субъединицы кислорода не содержат, — дезоксигемоглобин. Промежуточные формы неустойчивы, их содержание в любой момент времени невелико. Существованию двух взаимопревращающихся форм четвертичной структуры гемоглобина и обязан кооперативностью связывания и отщепления кислорода, а также рядом других функционально важных свойств.

8.3.2. Присоединение кислорода к гемоглобину и сопровождающие его изменения третичной структуры

Принято следующее, весьма огрубленное, описание цепи событий, сопровождающих присоединение молекулы кислорода к какой-либо из субъединиц гемоглобина.

Молекула кислорода проникает внутрь субъединицы и размещается между атомом железа гема и имидазольной группой дистального гистидина, которая, видимо, образует с одним из атомов кислорода

водородную связь. Присоединение кислорода изменяет электронное состояние атома железа, который до этого находился как бы "над" плоскостью гема, а теперь смещается на 0,4 — 0,8 Å, приближаясь к кислороду и втягиваясь в плоскость порфиринового кольца (рис. 8.6). Это движение приводит к соответственному смещению имидазола проксимального гистидина, образующего с железом связь, близкую к ковалентной. Смещение имидазола вызывает далее смещение всего остатка гистидина His F8 и всей α -спирали F, в которой этот остаток расположен. Понятно, что изменение структуры, начатое небольшим перемещением атома железа, охватывает немало атомов белка.

Важным последствием такого структурного перехода является то, что боковая p -оксibenзильная группа остатка тирозина Tyr HC2, располагавшаяся в дезоксигемоглобине между спиралью F и H, из-за их сближения вынуждена покинуть это место в структуре и выйти на поверхность молекулы (рис. 8.7). Заметим, что остаток Tyr HC2 предшествует C-концевому Arg HC3.

Резкое изменение позиции соседнего тирозина влечет за собой и изменение в расположении этого остатка аргинина, а значит, сразу двух заряженных групп: α -карбоксилат-иона и гуанидиниевой группировки, — которыми он обладает. До присоединения кислорода заряженные функциональные группы C-концевого остатка Arg HC3 одной из α -цепей ($\alpha 1$ -цепи) участвовали в образовании двух солевых связей. Карбоксилат-ион взаимодействовал с протонированной α -аминогруппой N-концевого остатка другой α -цепи ($\alpha 2$), обслуживая $\alpha 1$ — $\alpha 2$ -контакт. Катионная гуанидогруппа образовывала соль с карбоксилат-ионом Asp-126 в той же цепи $\alpha 1$. После присоединения кислорода C-концевой аргинин утрачивает обе эти связи и приобретает способность практически свободно вращаться. То же происходит и с C-концевым аргинином цепи $\alpha 2$, так что в оксигемоглобине контакт между одноименными субъединицами $\alpha 1$ — $\alpha 2$, и без того слабый, становится мало существенным.

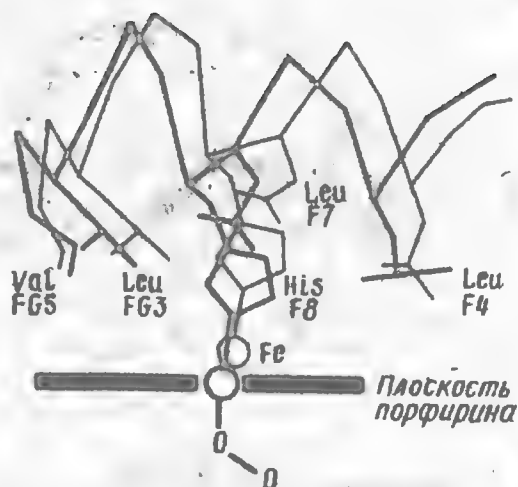
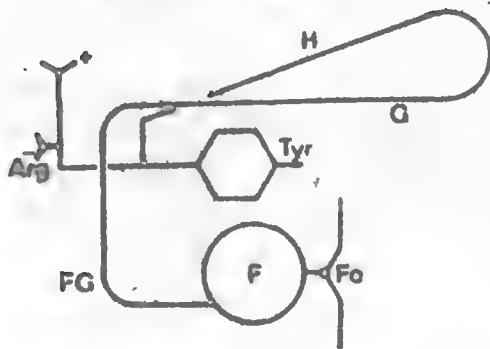


Рис. 8.6. Изменения конформации вблизи гема, сопровождающие присоединение кислорода к атому железа и переход субъединицы гемоглобина из дезокси- в оксиформу

Атом железа втягивается в плоскость порфиринового кольца, что вызывает смещение связанного с ним остатка гистидина F8, за которым следует движение всей спирали F и поворот FG

Дезоксиформа



Оксиформа

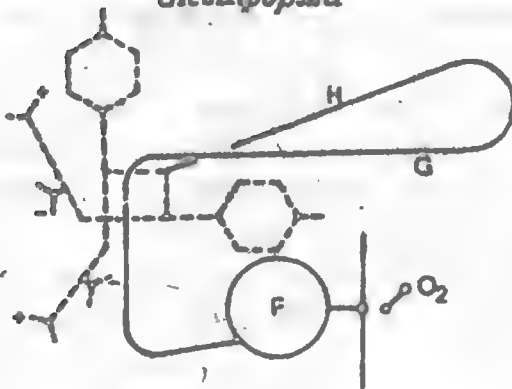


Рис. 8.7. Передача эффекта смещения спирали F на С-концевой аргинин.

Боковая цепь тирозина Tyr HC2 из-за сближения спиралей F и G оказывается "вытолкнутой" из пространства между ними, что приводит в движение С-концевой остаток аргинина (показано пунктиром). Это влечет за собой разрыв солевых мостиков, в которых участвуют концевые остатки аминокислот.

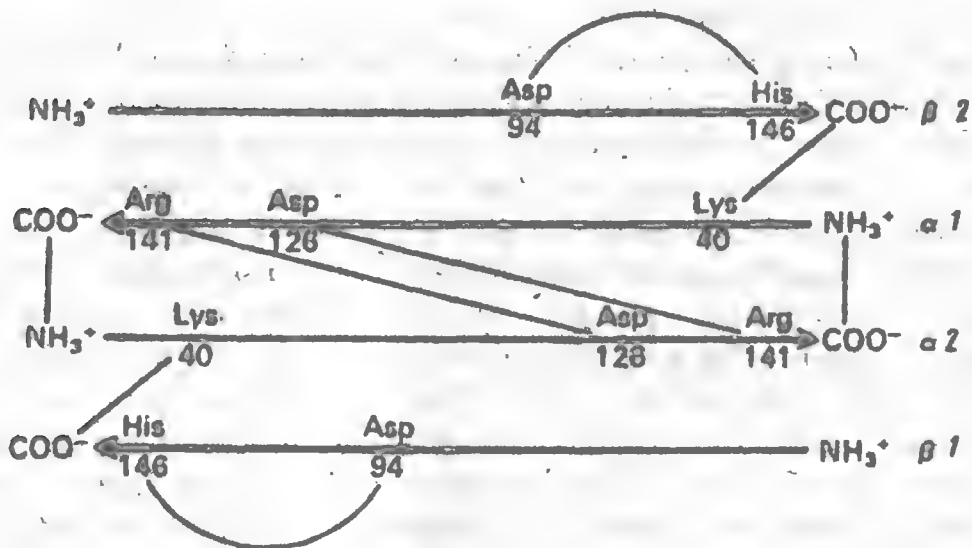


Рис. 8.8. Схема электростатических взаимодействий (показаны тонкими линиями) в молекуле гемоглобина.

Субъединицы условно изображены стрелками, направленными к С-концам. При присоединении кислорода (оксигенировании) эти связи утрачиваются.

Аналогично, в результате присоединения молекулы кислорода к гему β -субъединицы ($\beta 2$) происходит конформационная перестройка, начинающаяся со сближения дистального гистидина с железом гема. Ее итогом оказывается разрыв солевых связей C-концевого остатка His-146. Одна из них — между карбоксилат-ионом C-концевого гистидина и протонированной аминогруппой лизина Lys-40 цепи $\alpha 1$, другая — между имидазоль-катионом His-146 и карбоксилатом Asp-94 в той же цепи $\beta 2$. Это влечет за собой ослабление контакта $\alpha 1 - \beta 2$ (рис. 8.8).

8.2.3. Функциональная роль четвертичной структуры гемоглобина

В общей сложности при переходе от дезоксигемоглобина к полностью оксигенированной, насыщенной кислородом молекуле утрачиваются *осель ионных связей* как внутри субъединиц, так и между ними, причем затрагиваются относительно слабые контакты $\alpha 1 - \alpha 2$ и $\beta 1 - \beta 2$. Ослабление последних приводит к *релаксации молекулы гемоглобина* и дает возможность ее половинам — $\alpha - \beta$ -димерам — изменить свою ориентацию друг относительно друга. Это смещение достигает 7 Å (см. рис. 8.6); при этом наиболее прочный контакт $\alpha 1 - \beta 1$ практически не затрагивается.

Перемещение димеров $\alpha - \beta$ происходит как бы скачком, так как существует *два способа организации нековалентных взаимодействий* на контакте $\alpha 1 - \beta 2$. Его поверхность можно огрубленно представить в виде ласточкина хвоста (рис. 8.9), причем в одной (дезокси-, или T) форме относительное расположение субъединиц стабилизируется, в частности водородной связью между TyrC7 $\alpha 1$ -субъединицы и карбоксилатом AspG1 субъединицы $\beta 2$. При переходе в окси(R)-форму эта связь утрачивается, зато карбоксильная группа AspG1 $\alpha 1$ -субъединицы, оказавшись в стерически благоприятном положении после перемещения димеров друг относительно друга, дает водородную связь с AspG4 субъединицы $\beta 2$. Таким образом, контакт $\alpha 1 - \beta 2$ работает как своеобразный переключатель, способный принимать одно из двух состояний в зависимости от того, присоединился или нет кислород к соответствующим субъединицам.

Итак, присоединение молекулы кислорода к субъединице гемоглобина вызывает целую последовательность структурных изменений, распространяющихся от гема к периферии глобулы и смещающих ионизованные группы на ее поверхности. Речь идет о типичном для третичной структуры белка явлении — *передаче эффекта на значительные расстояния*. Если бы такой эффект оставался только в рам-



Рис. 8.9. Переход $\alpha 1\beta 2$ -контакта при оксигенировании гемоглобина

Контакт, имеющий форму "ласточкина хвоста", при оксигенировании и переходе молекулы из Т- в R- состояние может также находиться в одном из двух состояний. Утрата водородной связи Tyr C7—Asp G1 между $\alpha 1$ - и $\beta 2$ -субъединицами компенсируется установлением связи между Asp G1 и Asn G4

из четырех субъединиц. Более того, необходимость описанных изменений третичной структуры, противоречащих Т-структуре гемоглобина, препятствует присоединению первой молекулы кислорода и благоприятствует ее отщеплению.

Следовательно, присоединение первой и в меньшей мере второй молекулы кислорода будет протекать с трудом. Для него потребуется заметно большее парциальное давление кислорода, чем для насыщения миоглобина, где таких задержек нет. Действительно, этот процесс — начало насыщения гемоглобина кислородом — происходит в альвеолах легких, где парциальное давление кислорода велико.

как третичной структуры, его вклад был бы не столь значительным. Однако в гемоглобине он приводит к изменению ионных взаимодействий в слабом контакте между субъединицами, изменяя его и способствуя кооперативному переходу четвертичной структуры в иное состояние.

Следовательно, изменения, происшедшие в одной из субъединиц при присоединении кислорода, могут быть переданы на остальные субъединицы, которым будет выгодно изменить конформацию так, чтобы их третичная структура соответствовала перемировавшейся четвертичной, а значит, стала бы благоприятной для присоединения молекул кислорода. Понятно, что такая перестройка четвертичной структуры, ее переход из свойственной дезоксигемоглобину Т (от англ. tight — стянутый)-формы в характерную для оксигемоглобина релаксированную R (от англ. relaxed)-форму маловероятны (хотя в какой-то мере и возможны), если молекула кислорода присоединилась только к одной

Очень важно, что после присоединения двух молекул кислорода к гемоглобину четвертичная структура с примерно равной вероятностью может оказаться как в Т-, так и в В-форме. Последняя способствует присоединению третьей молекулы кислорода, после которого вероятность перехода всей структуры, в том числе и четвертой субъединицы, пока не "заряженной" кислородом, в структуру, облегчающую присоединение к ней кислорода, становится весьма высокой. Это ведет к быстрому завершению процесса насыщения всей тетрамерной молекулы кислородом. Таким образом, присоединение кислорода к гемоглобину, будучи кооперативным процессом, как бы следует принципу "отдай имеющему", что обеспечивает полноту "нагрузки" молекул-переносчиков кислородом в легких.

В тканях первая молекула кислорода отщепляется с определенными затруднениями, так как это требует изменений в контакте субъединиц, противоречащих свойственной оксигемоглобину четвертичной структуре. Однако эти затруднения преодолеваются благодаря низкому парциальному давлению кислорода, которое делает обратную реакцию маловероятной. Отщепление последующих молекул кислорода облегчается с каждым шагом, что приводит к полной "разгрузке" транспортной молекулы. Так, кооперативность обеспечивает эффективный перенос кислорода от легких к тканям. Как полагают физиологи, в отсутствие кооперативных эффектов, например, если бы эритроциты содержали миоглобин вместо гемоглобина, животные погибали бы от кислородной недостаточности в тканях.

8.2.4. 2,3-Дифосфоглицерат — эффектор, регулирующий функцию гемоглобина

Очевидно, что кооперативность присоединения и отщепления кислорода гемоглобином зависит от того, насколько легок или, наоборот, труден координированный переход четвертичной структуры из Т- в В-состояние. Оказалось, что 2,3-дифосфоглицерат, содержащийся в эритроцитах, способен избирательно взаимодействовать с дезоксигемоглобином, стабилизируя его четвертичную структуру (Т-форму). 2,3-Дифосфоглицерат несет пять отрицательных зарядов, которые могут быть распределены между восемью атомами кислорода. Его молекула связывается во впадине, образованной обеими β -субъединицами, где она взаимодействует сразу с семью катионными группами этих цепей. Это α -аминогруппы N-концевых Val-1, имидазольные кольца His-2 и His-143 обеих β -субъединиц, а также аминокислотный остаток Lys-82 какой-либо одной из них (рис. 8.10).

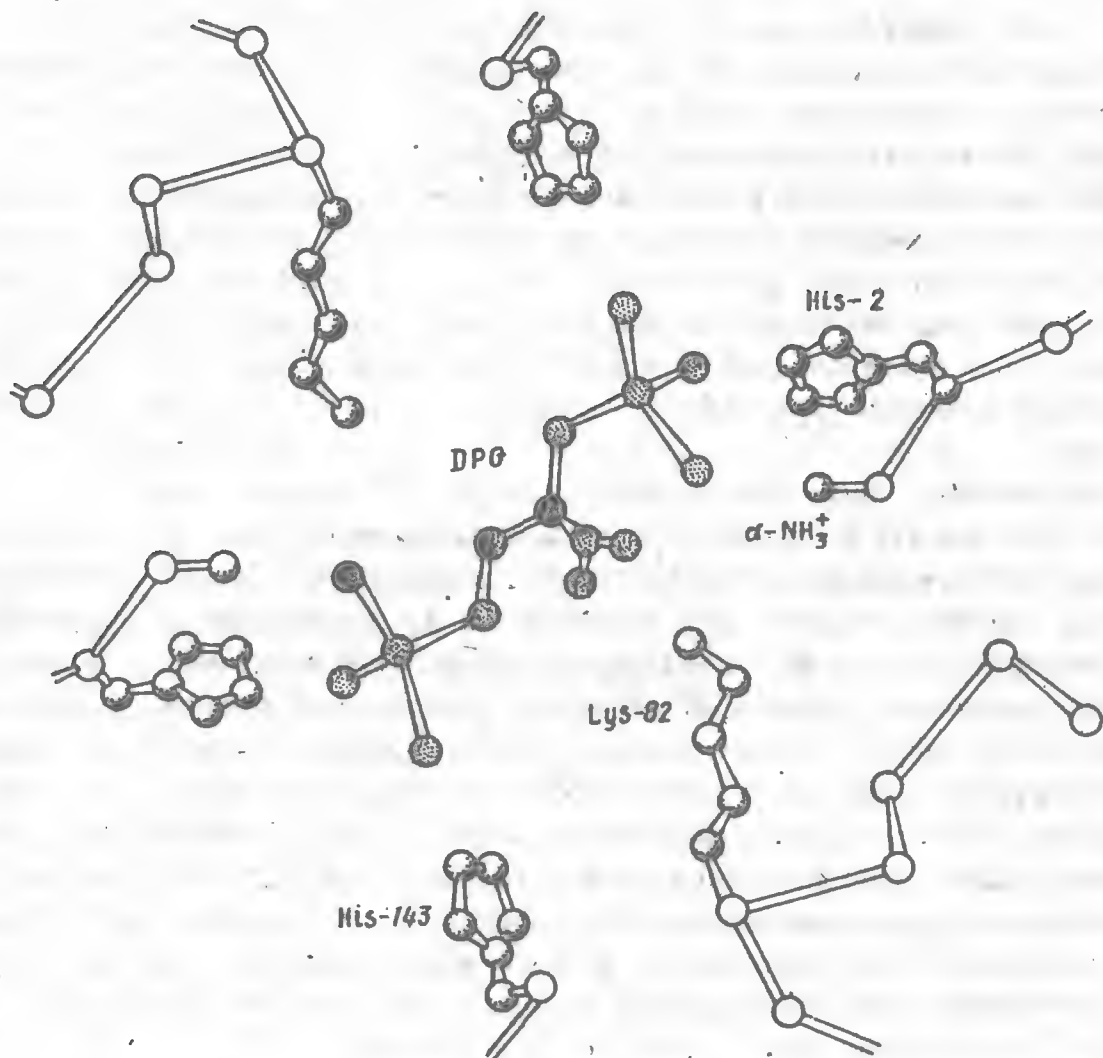


Рис. 8.10. Связывание дифосфоглицерата (DPG) с катионными группами β -субъединиц гемоглобина

Электростатические взаимодействия анионных групп 2,3-дифосфоглицерата с катионными группами дезоксигемоглобина (заштрихованы) существенно усиливают контакт между субъединицами, прежде всего очень слабый $\beta 1/\beta 2$ контакт. Стабилизация дезоксиформы эквивалентна понижению сродства к кислороду. Сродство может быть повышено у гемоглобинов, способных связывать кислород при низком парциальном давлении, за счет ослабления взаимодействия с эффектором. Так, в гемоглобине ламы связывание ослаблено заменой His-2 на Asn-2, в гемоглобине F (плода), — заменой His-143 на Ser-143, что уменьшает число катионных групп белка, взаимодействующих с анионными группировками эффектора

Стабилизация дезоксиформы понижает сродство к кислороду гемоглобина, образовавшего комплекс с 2,3-дифосфоглицератом. В отсутствие эффектора — 2,3-дифосфоглицерата — гемоглобин А взрослого человека насыщается кислородом на 50% при 12 мм рт.ст., в присутствии же дифосфоглицерата для 50%-ного насыщения гемоглобина кислородом необходимо уже его парциальное давление, равное 50 мм

рт.ст. 2,3-Дифосфоглицерат — соединение, структурно ничего общего не имеющее с кислородом и связывающееся участком гемоглобина, далеким от места присоединения кислорода. Тем не менее оно существенно влияет на взаимодействие кислорода и гемоглобина. Обладающие такой способностью соединения, которым принадлежит большая роль в регулировании функции белков в организме, получили название *аллостерических* (структурно далеких) *эффекторов*. Важно отметить, что сама возможность такого воздействия эффектора на структурно удаленный функциональный центр белка основана на способности четвертичной структуры отвечать на относительно слабые воздействия.

Изменения зоны связывания 2,3-дифосфоглицерата способны значительно влиять на сродство гемоглобина к кислороду. Так, в β -цепях гемоглобина южноамериканской ламы, живущей на больших высотах и нуждающейся в адаптации к пониженному парциальному давлению кислорода, остатки His-2 заменены остатками аспарагина, которые не несут катионной группы и не могут участвовать в связывании 2,3-дифосфоглицерата. Как следствие, дезоксиформа гемоглобина ламы оказывается менее стабилизированной и сродство к кислороду повышается. 50%-ное насыщение гемоглобина ламы наступает уже при парциальном давлении кислорода, равном 24 мм рт.ст. Функциональный смысл такой замены вполне очевиден, тем более что у одногорбого верблюда (эволюционного предка ламы), живущего на равнине, место связывания 2,3-дифосфоглицерата представлено семью катионными группами, включая и остатки His-2 β -цепей.

Гемоглобин F плода человека (*фетальный*) синтезируется только во время беременности и должен обеспечивать перенос кислорода от плаценты, где его парциальное давление составляет всего около 12 мм рт.ст., к тканям плода (по выражению физиологов, "плод дышит на высоте Эвереста"). Понятно, что гемоглобин F должен обладать большим сродством к кислороду, чем гемоглобин взрослого человека. Это также достигается за счет замены His-143 в β -цепи гемоглобина F на серин, что ослабляет связывание 2,3-дифосфоглицерата и уменьшает стабилизацию дезоксиформы гемоглобина.

8.2.5. Участие гемоглобина в транспорте CO_2 и ионов водорода

Кооперативные эффекты четвертичной структуры определяют способность гемоглобина выполнять помимо переноса кислорода ряд других транспортных функций, важных для физиологии кровообращения.

Гемоглобин переносит ионы водорода и CO_2 , направляющиеся в

тканях, к легким. Перенос ионов водорода обусловлен так называемым *эффектом Бора*. Как уже говорилось, при насыщении гемоглобина кислородом рвутся, а при его отщеплении — восстанавливаются ионные связи между отдельными функциональными группами. Разрыв или, наоборот, образование ионных связей сказывается на способности функциональных групп связывать протон. Это особенно характерно для сравнительно слабых оснований, pK_a которых близок к физиологическому значению pH . В таком случае уже небольшие изменения pK_a существенно влияют на способность группы присоединять и, значит, переносить протон. Такими группами являются α -аминогруппа и имидазольная группа гистидина. Так, в оксигемоглобине имидазольная группа С-концевого His-143 β -цепей свободна и имеет, по-видимому, нормальный pK_a для гистидина, близкий 6. После отщепления кислорода в тканях эта имидазольная группа восстанавливает ионную связь с карбоксилат-анионом остатка Asp-94 той же цепи, т.е. оказывается в поле отрицательного заряда. Понятно, что протон с большим трудом может покинуть имидазольный-катион, если положительный заряд последнего компенсирован сближенной с ним отрицательно заряженной группой.

Таким образом, способность имидазольного кольца С-концевого гистидина к связыванию протона регулируется положением этого кольца в пространственной структуре, его участием или неучастием в ансамбле с карбоксильной группой. Как следствие, дезоксигемоглобин, в котором основность имидазольной группы His-143 возрастает, присоединяет протон и переносит его от тканей к легким, где при насыщении гемоглобина кислородом и переходе его четвертичной структуры в релаксированную T -форму ион водорода отщепляется.

Перенос CO_2 гемоглобином обусловлен его способностью присоединяться к α -аминогруппам белка с образованием так называемой *карбаминовой кислоты* — полуамида угольной кислоты:



Эта реакция протекает в тканях с аминогруппами дезоксигемоглобина. Появившиеся отрицательно заряженные остатки карбаминовой кислоты вступают в ионные взаимодействия с катионными группами белка, дополнительно стабилизируя дезоксиформу. В легких при насыщении гемоглобина кислородом протекает обратная реакция, которая ведет к выделению CO_2 .

8.2.6. Аномальные гемоглобины

В популяции человека господствует нормальный гемоглобин А, однако с частотой примерно 1/1000 встречаются аномальные гемоглобины — мутантные белки, в которых произошла одиночная замена аминокислотного остатка другим. Такие замены могут происходить во многих положениях — известно около 200 аномальных гемоглобинов, тогда как α - и β -цепи в сумме содержат 288 аминокислотных остатков. Функциональные последствия замен весьма различны. Многие из них, в особенности происходящие на поверхности и не связанные с радикальным изменением природы аминокислотного остатка, безразличны для функциональных свойств, нейтральны и никак не выявляются клинически. Известно, однако, немало аномальных гемоглобинов, носители которых в большей или меньшей степени страдают от недостаточности функции гемоглобина. Тяжесть таких молекулярных болезней различна и обычно снижается за счет присутствия у гетерозигот нормального гемоглобина А.

Аномальные гемоглобины принято называть по местности, в которой была впервые обнаружена данная мутация. Во многих случаях удастся, основываясь на данных о строении гемоглобина, объяснить молекулярные механизмы того или иного нарушения структурных и функциональных свойств гемоглобина.

В гемоглобине *Вена* остаток Tyr-130 в β -цепи заменен аспарагиновой кислотой. Ее карбоксильная группа втягивается в гидрофобное ядро, занимая в нем место фенильного кольца тирозина, что дестабилизирует молекулу. Носители данной мутации страдают гемолитической анемией.

В гемоглобине *Хаммерслит* замена Phe-42 в β -цепи серином приводит к утрате весьма важного гидрофобного контакта с гемом. Более того, в гидрофобное окружение гема вторгается гидрофильная группа, а вслед за ней — вода. В результате дестабилизации гидрофобного ядра β -цепь оказывается неустойчивой, легко теряет гем, происходит нежелательное окисление железа.

В гемоглобине *Бостон* дистальный His E7 α -цепи заменен тирозином, фенольная группа которого образует ионную связь с ионом железа гема, не оставляя места для связывания молекулы кислорода. Аналогичная замена дистального гистидина на тирозин в β -цепи приводит к образованию аномального гемоглобина *Саскатун*.

К весьма серьезным последствиям приводят замены аминокислот в зонах контактов между субъединицами. Так, замена Tyr-35 в β -цепи на фенилаланин дезорганизует $\alpha 1 - \beta 1$ -контакт, так что белок распадается на мономеры.

Как уже отмечалось, нейтральными нередко оказываются мутации, затрагивающие аминокислотные остатки на поверхности молекулы. Однако в гемоглобине S (серповидно-клеточная анемия) замена поверхностного остатка Glu-6 в β -цепи валином приводит к образованию дезоксиформой надмолекулярных агрегатов — протяженных пучков, а затем и кристаллических структур. По-видимому, подаление гидрофобной аминокислоты в этой позиции недопустимо, так как ее боковая группа находит какую-то контактную площадку в другой части молекулы гемоглобина S, что и вызывает неконтролируемую агрегацию. Следует учитывать, что концентрация гемоглобина в эритроцитах очень велика и приближается к 35%, поэтому угроза образования агрегатов и даже осадков весьма реальна. Агрегаты гемоглобина S вызывают искажение формы эритроцитов, нарушая кровообращение в капиллярах.

Есть основания полагать, что мутация, приведшая к образованию гемоглобина S вместо гемоглобина A, произошла в средние века на Аравийском п-ве, откуда распространилась по путям миграции. В некоторых тропических районах распространения малярии эта мутация стала закрепляться, поскольку возбудитель малярии плохо адаптируется к существованию в эритроцитах, измененных присутствием агрегатов аномального гемоглобина. Это явление может служить простейшей моделью закрепления мутантных белков в популяции под давлением отбора.

Разумеется, аномальными могут быть не только гемоглобины, но и любые другие белки. В частности, описан ряд аномальных альбуминов сыворотки крови человека.

ГЛАВА 9

ХИМИЧЕСКОЕ МОДИФИЦИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Химическое модифицирование, т.е. проведение химических реакций, изменяющих ковалентную структуру белка, представляет собой один из важнейших приемов, используемых при характеристике функциональных групп белка. Метод долгое время доминировал в изучении структурно-функциональных отношений в белках, однако в последнее время он утратил монопольное положение, уступая во многих отношениях быстро развивающемуся сайт-специфическому мутагенезу. Тем не менее он в полной мере сохраняет значение как способ первичного поиска функционально значимых группировок в белковой молекуле, в особенности таких, которые наделены аномальной реакционной способ-

ностью (хотя на завершающих стадиях исследования метод сайт-специфического мутагенеза имеет серьезные преимущества).

Вместе с тем реакции химического модифицирования лежат в основе создания необратимых ингибиторов ферментов, используются при иммобилизации белков, особенно ферментов и антител, для биотехнологических задач, а также для изучения топографии поверхности белков и их локализации в сложных структурах, например мембранах и других надмолекулярных образованиях.

Реакции химической модификации белков очень многочисленны. Лишь немногие, наиболее представительные из них, будут рассматриваться далее.

9.1. ОСОБЕННОСТИ МЕТОДА ХИМИЧЕСКОГО МОДИФИЦИРОВАНИЯ

Обсуждая особенности метода, прежде всего следует подчеркнуть яркую специфичность белков как объектов химического модифицирования. Нередко, приступая к химическому модифицированию, исследователь вынужден исходить из упрощенного представления о белке как носителе определенного набора функциональных групп, принадлежащих боковым цепям аминокислотных остатков. При этом химические свойства последних как бы приравниваются к хорошо описанным и достаточно просто предсказываемым свойствам соответствующих групп в низкомолекулярных соединениях, в частности в пептидах и аминокислотах. Обзор реагентов, применяемых для модификации белков, который будет дан ниже, по существу основан именно на таком упрощении.

Не следует, однако, забывать об ограниченности этого подхода. Действительно, часть функциональных групп, главным образом те, что расположены на поверхности глобулы, окружены водой и не входят в систему контактов с другими группировками белка. С достаточным приближением они могут рассматриваться как аналогичные по реакционной способности таким же группам в малых молекулах, в частности пептидах. Однако число таких "канонических" групп не столь уж велико и, главное, не ими определяется химическая специфичность, особенность белковой молекулы.

Можно указать три основные причины радикального изменения химической активности функциональных групп, включенных в макромолекулу белка.

1. Часть функциональных групп скрыта внутри глобулы и, сле-

довательно, недоступна для химических реагентов (до тех пор, пока белок сохраняет нативную структуру). Так, в сравнительно небольшом белке — карбоксипептидазе А — полностью скрыты внутри глобулы один остаток тирозина и два триптофана; 13 остатков тирозина и 6 — триптофана находятся в поверхностном слое и частично доступны растворителю. Только четыре остатка тирозина погружены в окружающую белок воду и могут проявлять такие же химические свойства, как тирозин в небольших пептидах. Реакции химической модификации, рассчитанные на полное замещение всех доступных групп данного типа, используют для подсчета и идентификации скрытых (англ. *buried*) функциональных групп.

2. Многие функциональные группы контактируют с соседними группировками в белке, образуя своеобразные ансамбли. Участие в таких ансамблях способно сильно, подчас до полной неузнаваемости, изменить реакционную способность партнеров. Это подтверждается, в частности, тем, что константы диссоциации и соответствующие им pK_a ионогенных групп белка лежат в весьма широких диапазонах, иными словами, кислотно-основные свойства этих групп сильно зависят от их микроокружения.

Так, в небольших пептидах ω -карбоксильные группы боковых цепей аспарагиновой и глутаминовой кислот имеют pK_a , близкий 4,7, будучи похожими в этом отношении на карбоксил уксусной и других алифатических карбоновых кислот. Во всей совокупности белков, однако, их pK_a охватывают огромный интервал: от 1,5 (одна из карбоксильных групп активного центра пепсина) до 7,5 (карбоксильная группа остатка Glu-49 в α -субъединице триптофансинтетазы). Таким образом, в белках карбоксильные группы могут выступать и как весьма сильные кислотные группировки, практически полностью диссоциированные в физиологическом диапазоне pH, и как очень слабые, диссоциированные едва ли наполовину даже в нейтральной среде, а их константы диссоциации могут изменяться на шесть порядков.

Изменение реакционной способности той или иной функциональной группы может быть вызвано не только ее взаимодействием с какой-то другой группой (например, со второй карбоксильной группой, одна из которых становится сильной, а другая — слабой кислотой), но и локальным изменением полярности микроокружения данной группы. Например, полагают, что погружение β -карбоксильной группы остатка Glu-35 в гидрофобный участок лизоцима куриного яйца затрудняет диссоциацию протона, поскольку образующийся при этом анион не может стабилизироваться гидратацией; pK_a этой группы близок 6.

3. Поверхность белковой глобулы далеко не безразлична к реагентам, применяемым при модификации. Даже если эти реагенты не

содержат специально подобранных структур, способствующих избирательному связыванию в той или иной зоне белка (так называемая аффинная модификация); они с большой вероятностью будут связываться белком за счет взаимодействия с заряженными группами, гидрофобными участками поверхности, донорами или акцепторами водородных связей и т.п. Таким образом, собственно модификации предшествует связывание реагента определенным участком белковой структуры. Это приводит как бы к локальному концентрированию реагента в данной точке белковой молекулы и резко повышает вероятность вступления в реакцию функциональных групп, возможно, случайно соседствующих с участком связывания реагента.

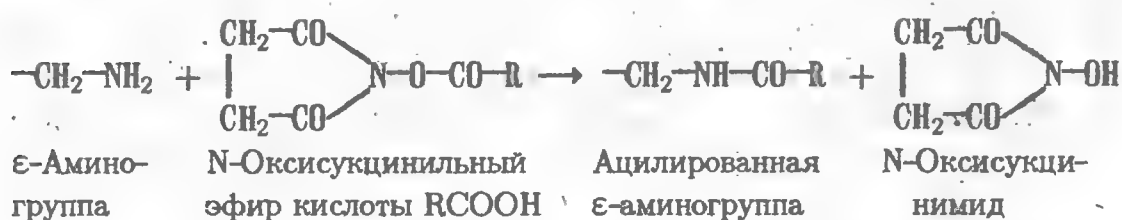
Нетрудно видеть, что отмеченные выше особенности поведения белка в реакциях химической модификации не случайны, а отражают фундаментальные свойства его структурной организации и функционирования. С методической точки зрения это означает, что при трактовке результатов химической модификации нельзя полагаться на сведения о реакционной способности соответствующих групп в модельных соединениях. Строго говоря, в каждом случае после проведения реакции и выделения продукта модификации (или разделения, если их несколько) необходимо прямыми методами установить, какие именно функциональные группы данного белка подвергались модификации, и определить, каким аминокислотным остаткам в полипептидной цепи белка они принадлежат. Таким образом, приводимый далее обзор реагентов и их реакций с функциональными группами белка дает лишь общую ориентировку относительно возможностей применения метода химического модифицирования.

9.2. ТИПОВЫЕ РЕАКЦИИ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП БЕЛКА

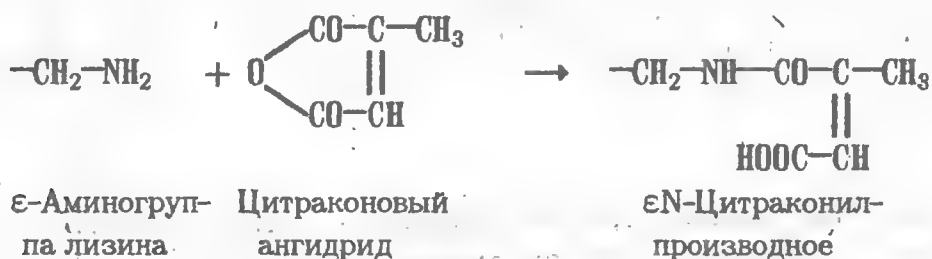
9.2.1. ϵ -Аминогруппы

ϵ -Аминогруппы принадлежат боковым цепям остатков лизина. Они располагаются, как правило, на поверхности глобулы, достаточно доступны и обладают химическими свойствами, характерными для алифатических первичных аминов. pK_a этих групп обычно близок 10, поэтому реакции с этими группами проводят в слабощелочных средах при pH 8 и выше, т.е. в условиях, когда они хотя бы частично депротонированы и могут выступать в качестве нуклеофильных агентов. Заметим, что α -аминогруппы реагируют сходным образом, однако на их реакционной способности сказывается несколько меньшая основность (pK_a около 8).

Ацилирование. Эти группы легко ацилируются, для чего могут быть использованы многие реагенты, например активированные эфиры кислот:

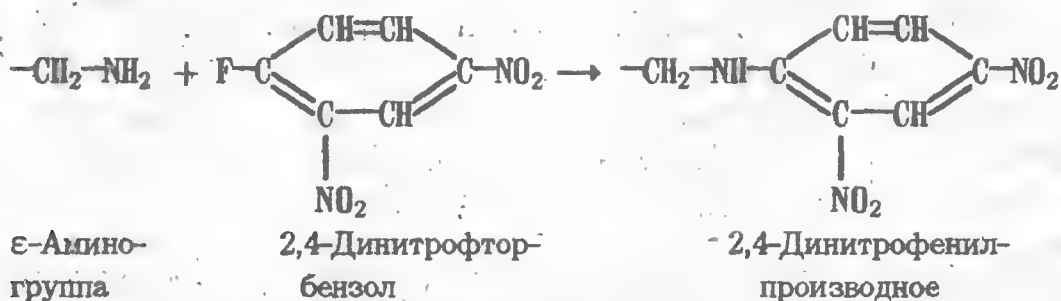


Однако близкие по нуклеофильности *фенолят-ионы* остатков *тирозина*, как правило, вступают параллельно в ту же реакцию. Для более избирательного блокирования аминогрупп можно воспользоваться гораздо меньшей стабильностью к гидролизу сложных эфиров, получающихся при ацилировании фенольного гидроксила тирозина. Эта неустойчивость особенно значительна в случае моноэфиров дикарбоновых кислот, которые образуются при ацилировании тирозина ангидридами, например янтарной или цитраконовой кислот. В этих случаях продукты модификации тирозина настолько нестабильны, что практически не обнаруживаются, так что удается достигнуть специфического ацилирования ε-аминогрупп лизина:



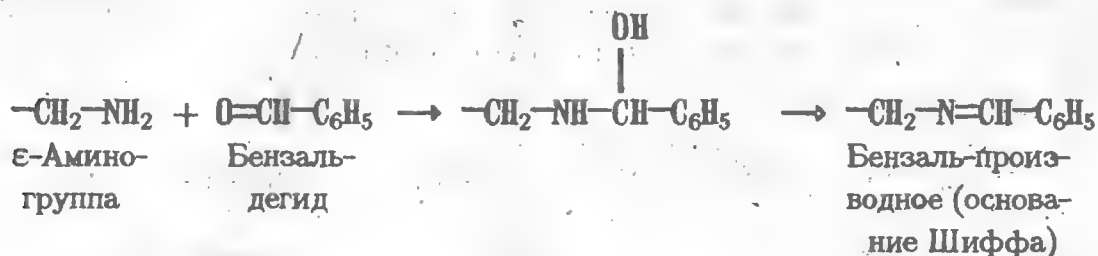
В полученном производном катионная в обычных условиях аминогруппа заменена анионным карбоксилат-ионом. Существенно, что продукты ацилирования аминогрупп лизина ангидридами дикарбоновых кислот вследствие сближенности высвободившейся при реакции карбоксильной группы с вновь образованной амидной связью лабильны и в кислой среде остатки дикарбоновых аминокислот отщепляются, высвобождая ε-аминогруппы остатков лизина. Такую возможность обратимого блокирования ε-аминогрупп лизина используют для того, чтобы проводить гидролиз трипсином модифицированного, например цитраконилированного, белка сначала только по остаткам аргинина, а после разделения получающихся крупных фрагментов и деблокирования ε-аминогрупп — по остаткам лизина.

Арилизирование. ε-Аминогруппы остатков лизина могут выступать в качестве нуклеофильных агентов в реакциях с 2,4-динитрофторбензолом и другими ароматическими активированными галоидными соединениями:



В образующемся динитрофенил-производном характерного желтого цвета ($\lambda_{\text{max}} \approx 350\div 360$ нм) азот аминогруппы полностью утрачивает основные свойства, а гидрофильная аминогруппа заменяется весьма гидрофобной структурой.

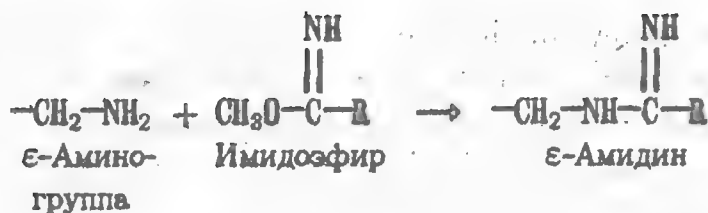
Образование оснований Шиффа. Аминогруппы реагируют с альдегидами, взаимодействуя с карбонильной группой в два этапа по следующей схеме:



Эта реакция избирательна, однако основания Шиффа малоустойчивы и легко, особенно в кислой среде, расщепляются с регенерацией свободных аминогрупп и альдегида. Учитывая это, прибегают к закреплению образовавшейся структуры путем восстановления двойной связи —CH=N— боргидридом натрия NaBH_4 :



Преобразование в амидины. Модификация ε-аминогрупп лизина указанными реагентами приводит к изменению заряда в данной точке белковой молекулы, а иногда к введению гидрофобного заместителя. Реакция с имидоэфирами отличается тем, что в ее результате катионная аминогруппа замещается также катионной *амидиновой* — основность которой несколько выше, чем у аминов:



Если заместитель R невелик, то такая модификация приведет только к замене аминогруппы на амидиновую — ни заряд, ни гидрофильность при этом заметно не изменятся, что позволит с большей уверенностью интерпретировать результаты модификации. По этим же соображениям бис-имидозфире охотно используют для соединения двух белковых молекул друг с другом. При обработке производного белка, модифицированного имидозфиром по описанной схеме, большим избытком первичного амина, например метиламина, происходит перенос амидиновых групп на этот амин, остатки лизина высвобождаются и белок удается регенерировать.

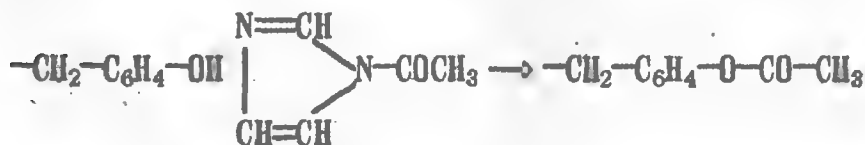
9.2.2. Фенольные группы тирозина

Гидроксильные группы тирозина в белках располагаются частично внутри, частично на поверхности белковой глобулы. В последнем случае для них характерен $pK_a \approx 10$, соответствующий полупереходу:



Образующийся при этом фенолят-ион весьма активно вступает в реакции, свойственные также и ϵ -аминогруппам лизина, в частности в реакцию ацилирования.

Ацилирование. Эта реакция может проводиться различными реагентами, например ацетилимидазолом:



Гораздо характернее для тирозина, однако, реакции замещения в ароматическом ядре, рассматриваемые далее.

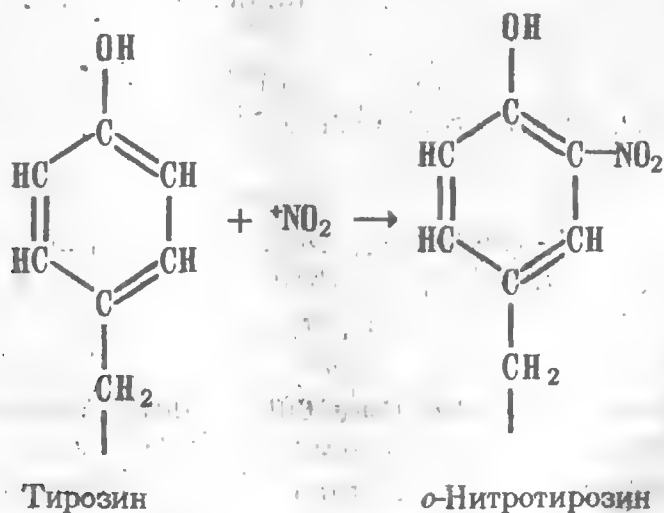
Иодирование. Эту реакцию особенно часто применяют как способ введения радиоактивных изотопов иода в белковую молекулу. Источником атомов иода может служить комплекс иода и иодистого калия; в некоторых случаях используют иод, образующийся при окислении

иодид-иона в присутствии фермента пероксидазы. Последний способ делает реакцию более избирательной, так как образование свободного иода происходит там, куда может проникнуть крупная молекула пероксидазы. Иодирование приводит к образованию как моно-, так и диодтирозина, причем замещение происходит в *o*-положении:



Результат введения иода в остаток тирозина неоднозначен: наряду с включением в структуру одного или двух объемистых атомов иода становится значительно более кислым гидроксил фенольной группы. Эту реакцию, нередко используют для мечения белка радиоактивным иодом, причем модификации могут подвергаться различные остатки тирозина, локализованные на его поверхности.

Нитрование. Нитрование достигается действием тетранитрометана $\text{C}(\text{NO}_2)_4$, причем в роли активной частицы обычно выступает нитроний-катион, $^+\text{NO}_2$:



И в этом случае возможно, хотя и проходит со значительно большим трудом, введение второй нитрогруппы (также в *o*-положение).

Гидроксильная группа в *o*-нитротирозине, по существу, такая же, как в *o*-нитрофеноле, имеет выраженные кислотные свойства. Наряду с нитроний-катионами тетранитрометан образует и частицы со свойствами свободных радикалов $\cdot\text{NO}_2$. Они также реагируют с образованием *o*-нитротирозина, однако неспаренный электрон, делокализованный в ароматическом ядре, вызывает ряд побочных реакций, в частности димеризацию остатков *o*-нитротирозина.

Азосочетание. Реакция остатков тирозина с ароматическими солями диазония, также являющимися катионными реагентами, опять-таки приводит к образованию моно- и ди-*o*-замещенных продуктов с достаточно протяженной системой сопряженных двойных связей, что придает им глубокое, обычно красно-оранжевое окрашивание (так называемая *реакция Паули*, иногда применяемая для обнаружения белков и пептидов, содержащих тирозин или гистидин):



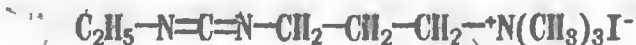
Эта реакция также приводит к усилению кислотных свойств гидроксильной группы тирозина. Она достаточно специфична, затрагивая помимо тирозина лишь остатки гистидина. Однако иногда наблюдается реакция солей диазония с аминогруппами лизина, дающая чрезвычайно нестабильные триазены. Для аналитического определения *o*-нитро- и азотирозина иногда прибегают к восстановлению соответственно нитро- или азогрупп до аминогруппы. Получающийся при этом *o*-аминотирозин сохраняется при полном кислотном гидролизе белка и может быть определен с помощью аминокислотного анализатора.

9.2.3. Реакция карбоксильных групп

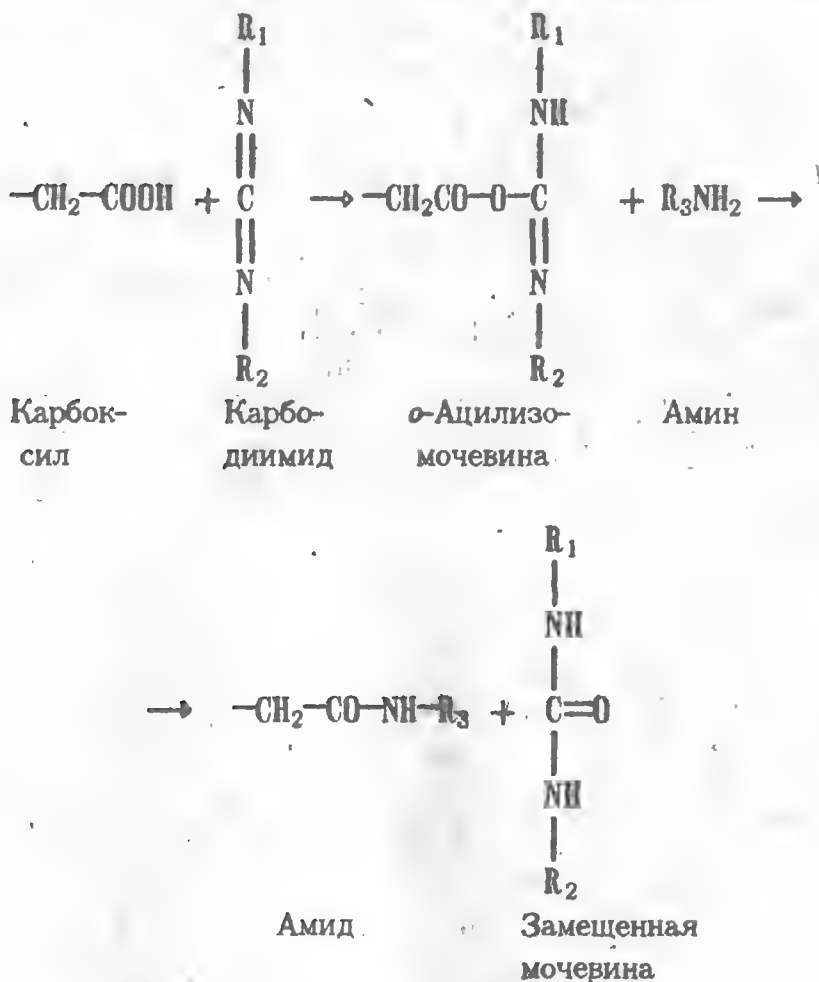
ω -Карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот, как правило, весьма многочисленны и в большинстве своем размещены в поверхностном слое белка. Как уже упоминалось, их реакционная способность существенным образом зависит от микроокружения.

Наиболее часто применяют следующие методы модификации этих групп.

Реакция с аминами в присутствии карбодиимидов. Эту реакцию проводят в воде, используя водорастворимые карбодиимиды, например N-этил-N'-триметиламинопропилкарбодиимид:

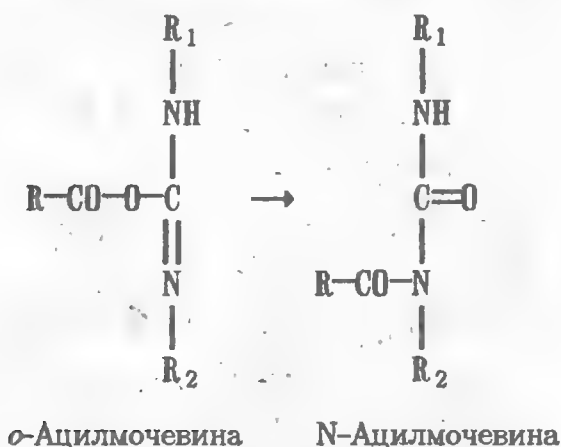


Реакция с этим или другими карбодиимидами протекает по следующей схеме ($\text{R}_1\text{-N}=\text{C}=\text{N-R}_2$ — карбодиимид, $\text{R}_3\text{-NH}_2$ — алифатический амин, часто метиловый эфир глицина):

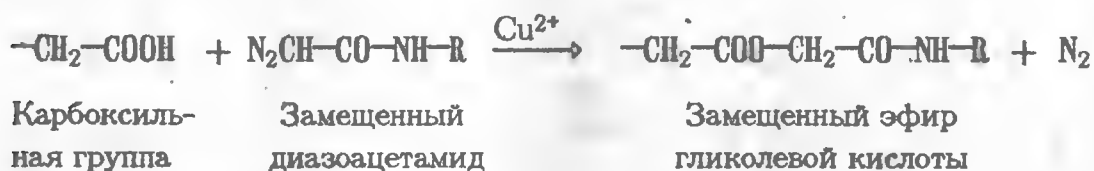


Если провести исчерпывающее замещение карбоксильных групп в белке, используя в качестве амида метиловый эфир глицина или лучше метиловый эфир небелковой аминокислоты, например норвалина, то по аминокислотному составу продукта реакции можно определить число карбоксильных групп, которые в нее вступили и, следовательно, число доступных для реагента карбоксильных групп. Как правило, оно велико и скрытыми оказываются лишь единичные группы.

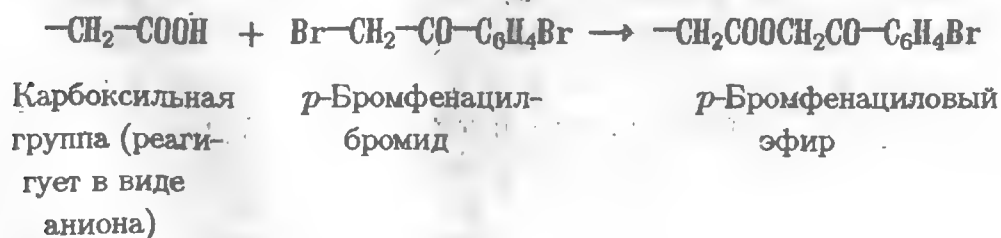
Следует иметь в виду, что продукт активации карбоксильной группы — *o*-ацилизомочевина — может не только вступать в реакцию с амином, но и стабилизироваться в результате внутримолекулярного переноса ацильного остатка с атомом кислорода на азот. Это приводит к образованию весьма стабильной *N*-ацилмочевины:



Реакции с алифатическими diaзосоединениями. Стабильные алифатические diaзосоединения, например производные диазоацетамида, в присутствии ионов меди реагируют с некоторыми карбоксильными группами, например с карбоксильной группой одного из остатков аспарагиновой кислоты в активном центре пепсина или других аспартильных протеиназ:

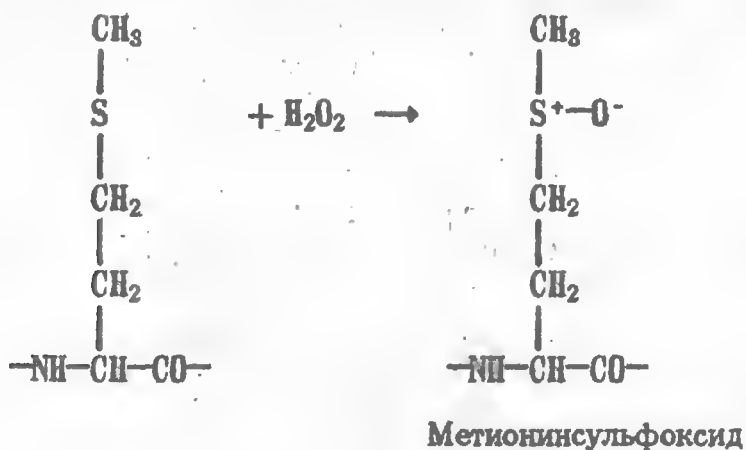


Алкилирование карбоксильных групп. В качестве агентов, алкилирующих некоторые карбоксильные группы в белках, могут использоваться α -галоидкетоны, например *p*-бромфенацилбромид $Br-CH_2CO-C_6H_4Br$ и его аналоги, а также α -галоидкислоты. Реакция с *p*-бромфенацилбромидом протекает следующим образом:

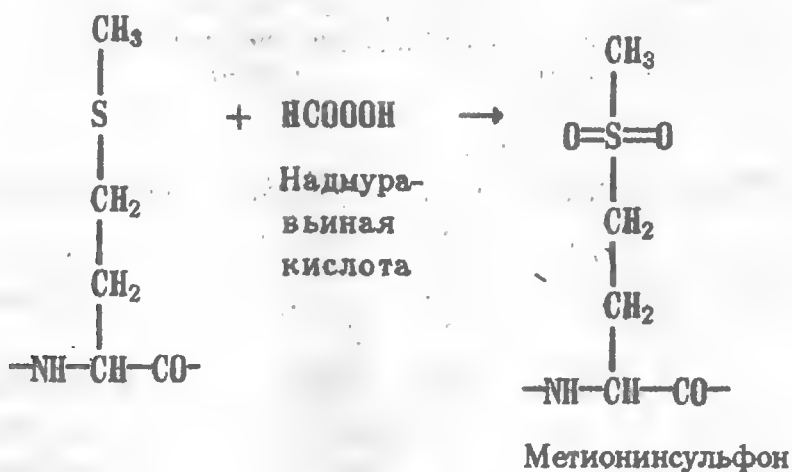


9.2.4. Модификация остатков метионина

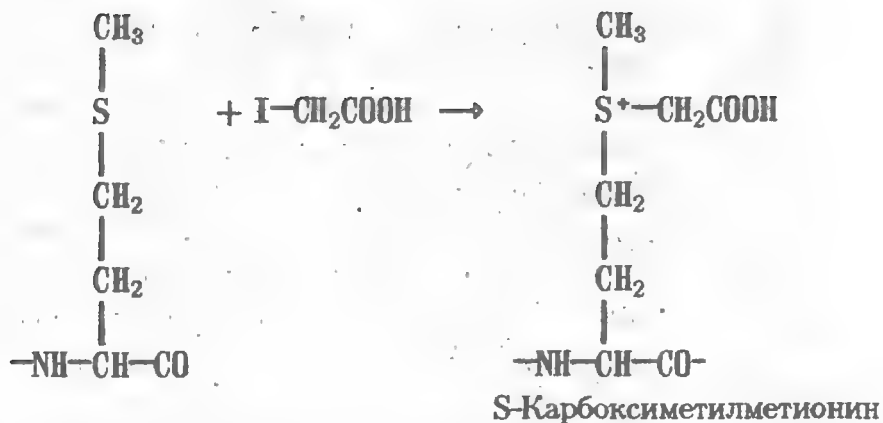
Остатки метионина в белках и особенно пептидах легко окисляются до метионинсульфооксида:



В ряде случаев эта реакция протекает даже под действием кислорода воздуха. В более жестких условиях, например при действии надмуравьиной кислоты, окисление проходит глубже и приводит к метионинсульфону:



Для модифицирования остатков метионина чаще, однако, применяют алкилирующие агенты, например уже упоминавшийся *p*-бромфен-ацилбромид или α -галоидзамещенные кислоты, в частности модуксусную кислоту или ее амид. При этом характерно, что сера метионина реагирует с такого рода соединениями даже в слабокислой среде, когда большинство других нуклеофильных групп белка, в частности имидазольные группы гистидина, в реакцию не вступают, будучи протонированы:

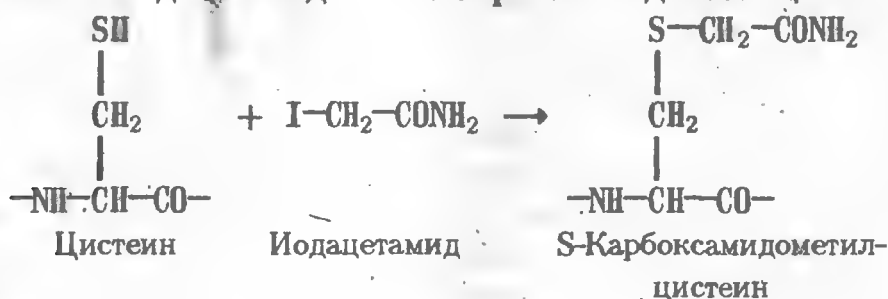


Аналогично протекает реакция остатков метионина с α -бромкетонами.

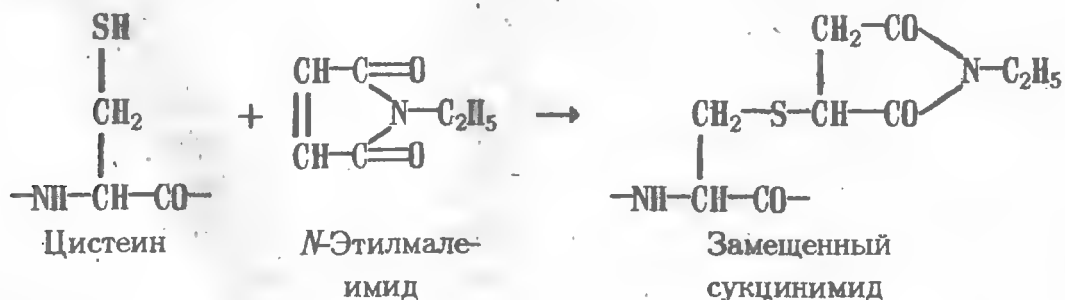
9.2.5. Модификация остатков цистеина

Сульфгидрильные группы остатков цистеина весьма реакционноспособны и могут участвовать как в реакциях замещения в качестве нуклеофильного компонента, чему благоприятствует их диссоциация с образованием тиолят-иона (pK_a около 8), так и подвергаться окислению или образовывать прочные соли с ионами тяжелых металлов.

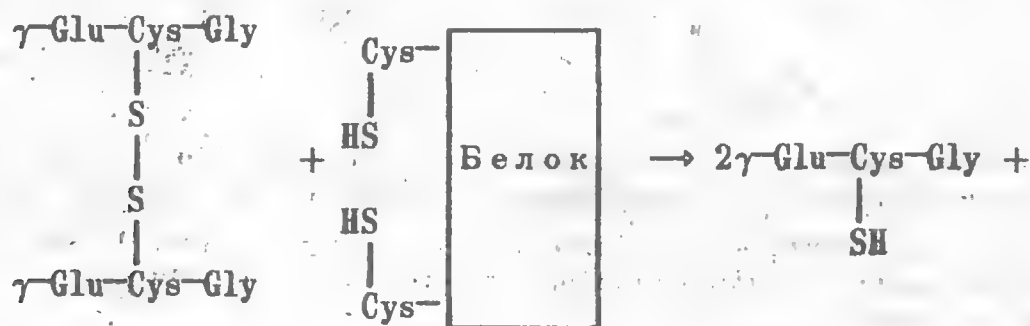
Алкилирование тиоловых групп. Тиоловые группы легко алкилируются в слабощелочной среде. Например, при действии иодуксусной кислоты остатки цистеина превращаются в S-карбоксиметилцистеин, при действии иодацетамида — в S-карбоксамидометилцистеин:



Тиоловая группа цистеина легко присоединяется к двойным связям, если они активированы сопряженной карбонильной группой или другим способом:



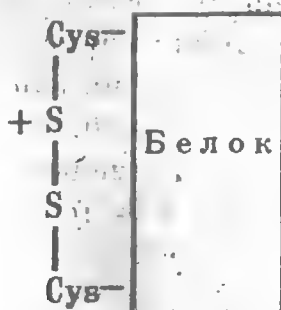
Окисление сульфгидрильных групп. Сульфгидрильные группы остатков цистеина могут окисляться с образованием дисульфидных групп, т.е. превращаться в остатки цистина в сравнительно мягких условиях, в частности под действием кислорода воздуха. Эта реакция специфична и может сопровождаться лишь окислением серы в метионине. Иногда, в частности при ренатурации белков, для перевода остатков цистеина в остатки цистина прибегают к реакции *дисульфидного обмена*, для чего особенно подходящей считается окисленная форма глутатиона:



Окисленная форма
глутатиона

Белок со свободными
тиоловыми группами

Восстановленная
форма глутатиона



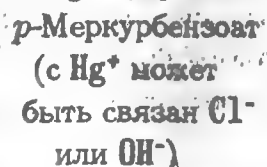
Белок с внутримолекулярной
дисульфидной связью

Разумеется, эта реакция обратима, однако равновесие может быть практически полностью сдвинуто в сторону образования дисульфидной (как правило, внутримолекулярной) связи в белке за счет большого избытка окисленной формы глутатиона. На реакции дисульфидного обмена основано использование так называемого *реактива Элмана* — 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной) кислоты для количественного определения свободных сульфгидрильных групп в белках. При взаимодействии с последними происходит восстановление дисульфидной связи в реактиве. Образующаяся 5-меркапто-2-нитробензойная кислота за счет диссоциации сульфгидрильной группы в щелочной среде дает харак-

1900



... ..

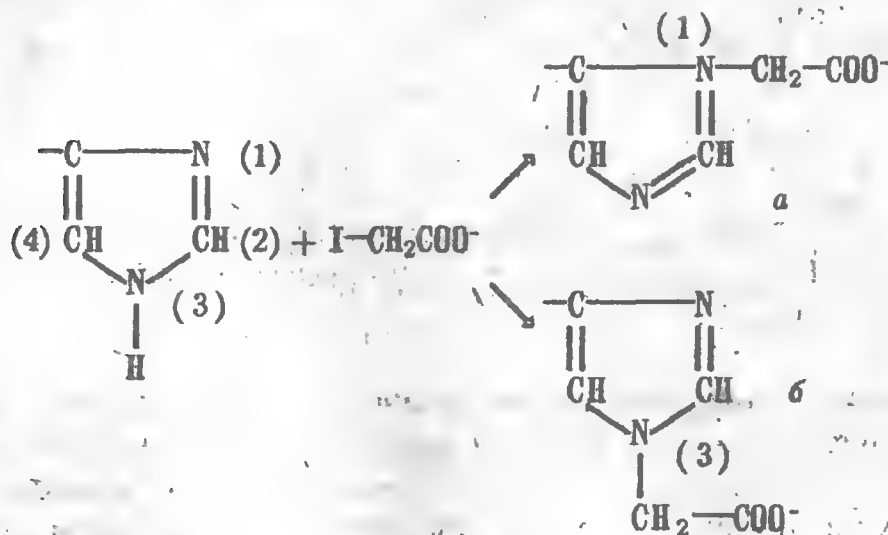


194

Образование меркаптида *p*-меркурбензойной кислоты сопровождается характерным изменением УФ-спектра, что может быть использовано для количественного определения свободных сульфгидрильных групп в белках и пептидах, хотя этот способ менее удобен, чем реакция Элмана.

9.2.6. Модификация имидазольной группы гистидина

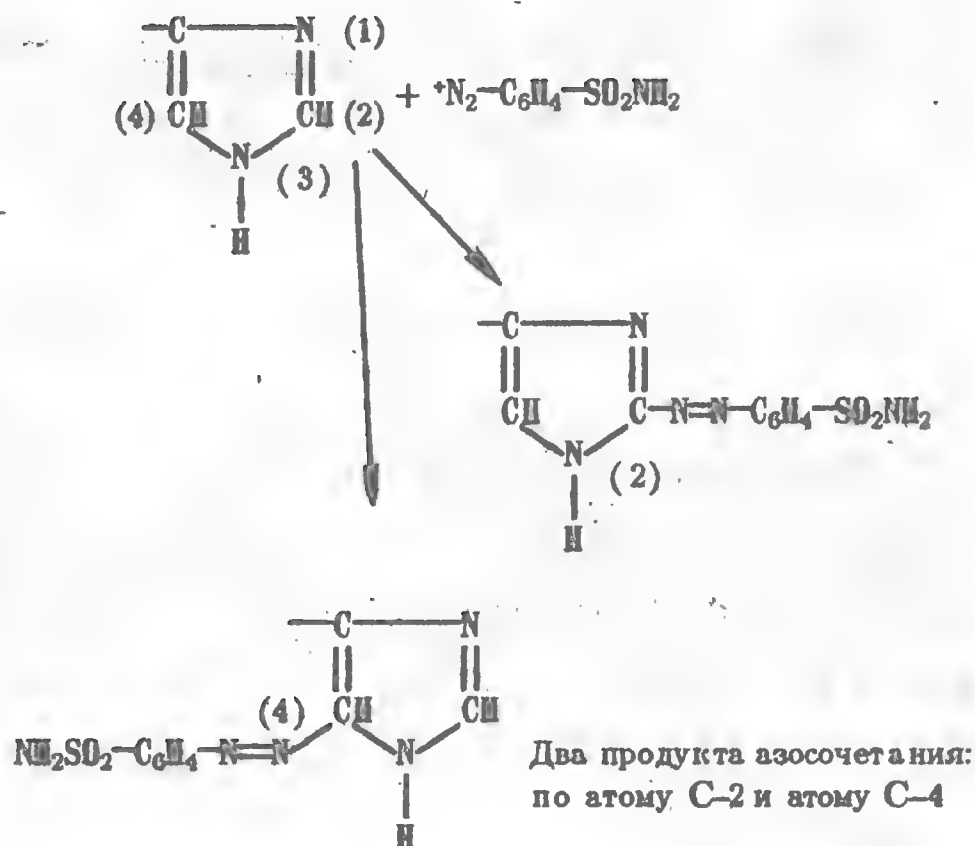
Алкилирование. Имидазол гистидина легко вступает в реакции алкилирования, например с *iodoacetic acid* или ее амидом в нейтральной или слабощелочной среде, причем в зависимости от микроокружения этой группы в белке или способа связывания алкилирующего реагента реакция может происходить по одному или по другому атому азота (по N-1 или N-3):



N-1 (a) и N-3 (б) - карбоксиметилгистидин

Следует учитывать, что двойная связь в системе $\text{N}=\text{C}-\text{N}$ имидазола гистидина способна перемещаться и занимать любое из двух положений. Реакция алкилирования не является характерной только для гистидина, она может протекать также с остатками метионина, лизина и даже с некоторыми карбоксильными группами, что зависит от pH и в значительно большей мере от особенностей микроокружения модифицируемого остатка.

Азосочетание. Реакция азосочетания может затрагивать в имидазольной группе гистидина как атом C-2, так и атом C-4.

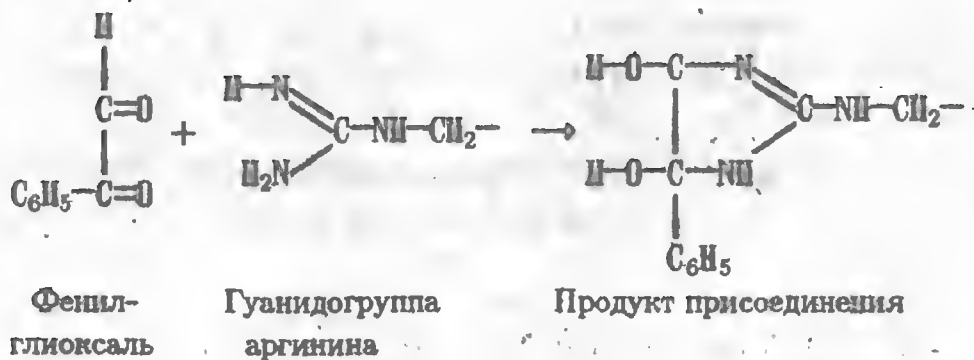


Продукты азосочетания гистидина с различными солями диазония (на схеме показана реакция с амидом диазосульфаниловой кислоты) имеют интенсивную, обычно красно-оранжевую окраску (реакция Паули).

Для избирательной деструкции остатков гистидина прибегают к фотоокислению кислородом в присутствии сенсibiliзирующих красителей.

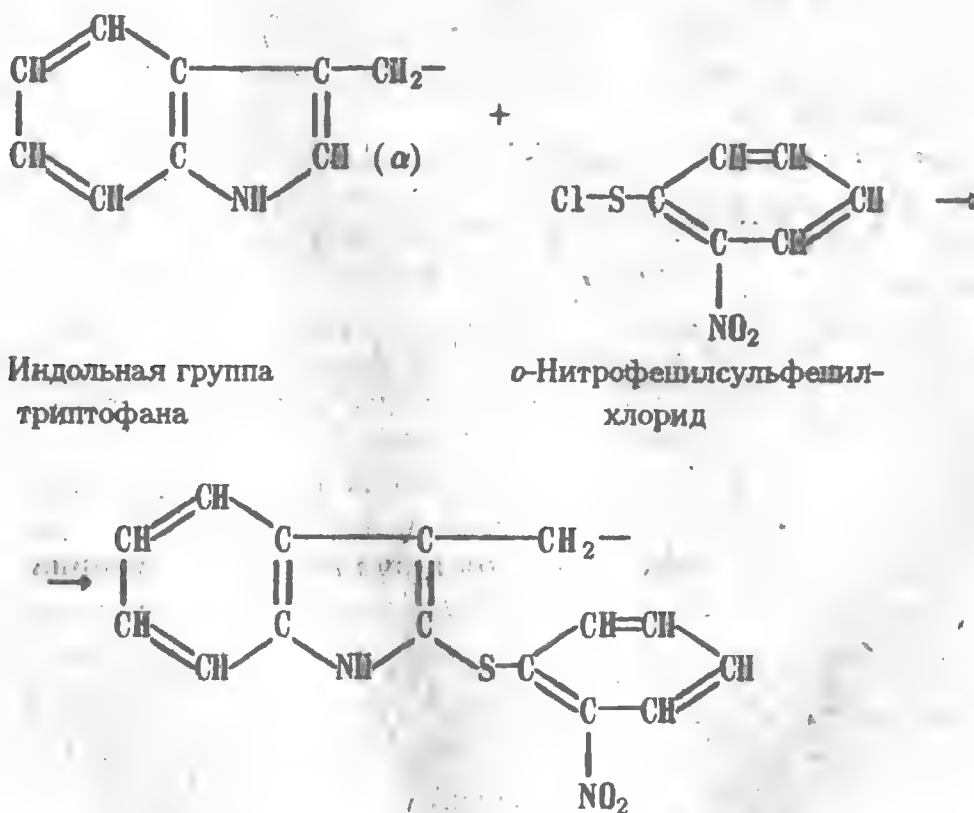
9.2.7. Модификация гуанидогруппы аргинина

Эта задача является особенно трудной, поскольку δ -гуанидогруппа аргинина является очень сильным основанием ($\text{pK}_a \approx 14$) и может быть депротонирована, что позволило бы ей выступать в качестве нуклеофила лишь в крайне жестких условиях, при такой концентрации щелочи, которая обрекает белок на глубокую денатурацию. Удастся, однако, использовать для избирательной модификации аргинина способность гуанидогруппы вступать в реакции образования гетероциклов с некоторыми дикетонами или альдегидкетонами:



9.2.8. Модификация индола в триптофане

Индольная группировка весьма лабильна, в частности она претерпевает деструкцию при фотосенсибилизированном окислении. Среди химических методов упомянем реакцию с *о*-нитрофенилсульфенилхлоридом, которая протекает по α -углеродному атому пиррольной части индола:



Заканчивая краткий обзор реагентов, используемых при модификации отдельных аминокислотных остатков в белках, отметим, что ко многим аминокислотам этот метод вовсе неприменим. Таковы все гид-

рофобные аминокислоты, глицин, пролин. Нет общих подходов к модификации серина, треонина, аспарагина и глутамина.

9.3. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ХИМИЧЕСКОГО МОДИФИЦИРОВАНИЯ

Необходимо еще раз подчеркнуть, что приведенные выше данные о реакциях функциональных групп белка ориентировочны. За исключением, возможно, образования меркаптидов, эти реакции не могут рассматриваться как строго специфичные. Ввиду этого *истолкование результатов химического модифицирования представляет большие возможности*. Как правило, необходимо разделение продуктов модификации, за которым должна следовать локализация модифицированных аминокислотных остатков путем фрагментации белка и выделения пептидов, содержащих остаток реагента. Экстраполяция результатов, полученных при действии тех или иных реагентов на функциональные группы в модельных структурах — аминокислотах, пептидах и даже белках, весьма опасна, особенно если речь идет о компонентах активных центров, поскольку химические свойства таких групп могут быть сильно видоизменены вследствие их участия в системе нековалентных взаимодействий.

9.3.1. Химическое модифицирование как способ выявления роли функциональных групп белка

Как отмечалось, в исследовании структуры и функциональных свойств белка данный метод в значительной мере вытесняется сайт-специфическим мутагенезом (белковой инженерией). Тем не менее при изучении механизма действия многих белков начальные сведения о функционально значимых аминокислотных остатках были получены именно методом химического модифицирования. Так, участие карбоксильных групп двух остатков аспарагиновой кислоты в аспартильных протеиназах было впервые продемонстрировано при помощи специфических реакций с производными диазоацетамида и диазокетонами, при изучении сериновых протеиназ огромную роль сыграло выявление особой роли остатка серина, специфически реагирующего с диизопропилфторфосфатом и т.д. Эти результаты в дальнейшем подтвердились рентгеноструктурными исследованиями и сайт-специфическим мутагенезом. Нет сомнения, что метод химической модификации будет и в дальнейшем играть ответственную роль, в особенности при поиске функционально важных структур в новых семействах белков.

Это обусловлено тем, что функционально активные центры, как правило, содержат ансамбли групп, функциональные группы в необычном окружении, что изменяет, делает нестандартными их химические свойства. Именно поэтому поиск аминокислотных остатков, обладающих аномальной реакционной способностью, составляет важный этап исследования белка.

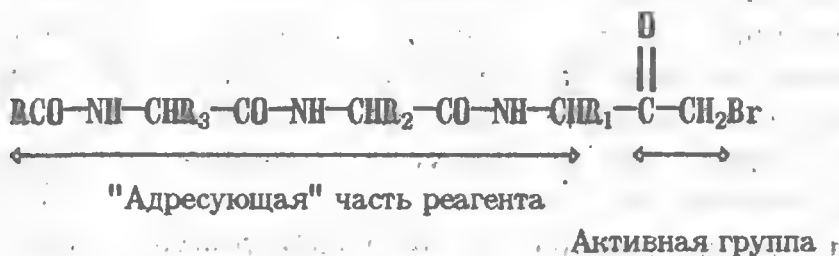
В то же время следует учитывать еще одну трудность, внутренне присущую трактовке результатов, полученных любым методом модифицирования. Получив данные о том, что присоединение к некоей группе белка заместителя R, вызывает характерное изменение его функциональных свойств, например утрату активности, нелегко определить, произошло ли это вследствие блокирования данной функциональной группы или же в результате сближения остатка R в данную точку белка, где его присутствие недопустимо (например, из-за вызываемых этим заместителем стерических осложнений). Расчет на то, что применение реагентов с очень небольшими радикалами R снимет проблему, вряд ли оправдан, так как помехи вовсе не обязательно связаны с размерами. Это делает результаты химического модифицирования не всегда однозначными. Заметим, что и метод сайт-специфического мутагенеза сопряжен с такой же неопределенностью. Впрочем, это осложнение может быть снято, если удастся использовать не один, а серию реагентов с принципиально различными R.

9.3.2. Аффинные реагенты

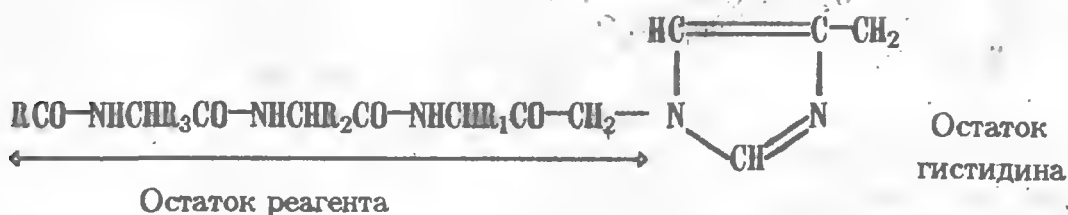
Как бы ни был построен реагент, используемый при химической модификации, его взаимодействие с той или иной функциональной группой всегда начинается с того, что он связывается в ее окрестности. Таким образом, специфичность, избирательность реакции определяется не только химическими особенностями, внутренне присущими данной функциональной группе в белковой структуре, но и наличием вблизи нее благоприятных (или, наоборот, неблагоприятных) условий для связывания модифицирующего реагента. Для изучения функциональных групп в активном центре белка выгодно использовать такие соединения, в которых собственно химически активная группа присоединена к структуре, "узнающей" активный центр, точнее ту его часть, которая ответственна за связывание специфического лиганда (например, субстрата или эффектора). Такие адресованные реагенты с большой вероятностью сорбируются в активном центре и затем образуют ковалентную связь с теми или иными функциональными группами, локализованными в нем. Протеканию реакции благоприятствует сближение химически активной группы реагента и модифицируемого ами-

нокислотного остатка, поэтому собственная реакционная способность первой может и не быть высокой.

В качестве примера можно указать на целый ряд пептидилбром-метилкетонов, построенных следующим образом:



Пептидная (адресующая) часть такой молекулы специфически присоединяется к протеиназе за счет образования системы водородных связей между пептидными группировками аналога субстрата и фермента, а также взаимодействия боковых радикалов R_1 , R_2 и R_3 с зоной связывания. В результате реакционноспособная группировка COCH_2Br оказывается пространственно сближенной с активным центром. В сериновых протеиназах она избирательно реагирует с имидазольной группой гистидина, принадлежащего активному центру:

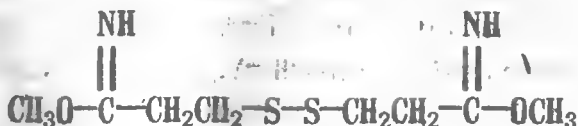


9.3.3. Химическое модифицирование в изучении

межмолекулярных комплексов в синтезе

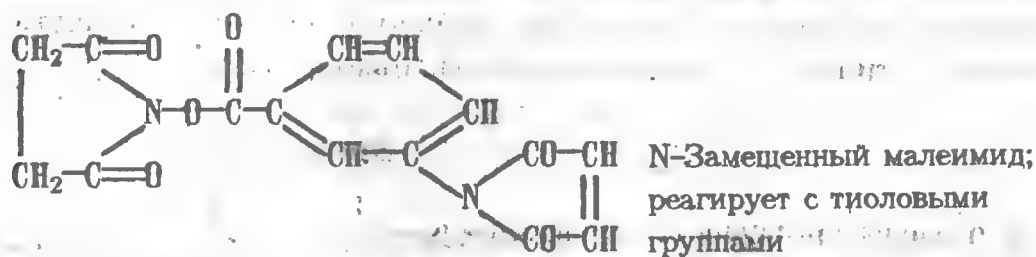
конъюгатов белков

Важной областью применения химической модификации является соединение, "сшивка" белковой молекулы с другими молекулами, сближенными с ней в биологических структурах. Это открывает возможность изучения геометрии подчас весьма сложных межмолекулярных комплексов. Так, *бифункциональный реагент*, диметил-3,3'-дитиобис-пропиоимидат



способен модифицировать, подобно монофункциональному имидозфиду, ε-аминогруппы лизина, отстоящие друг от друга примерно на 12 Å. Это позволяет "сшивать" соседние белки в субъединице рибосом, Г-актин и фрагмент миозина, белки в мембранах эритроцитов и т.д. Существенно, что "сшивка" содержит в этом случае дисульфидную связь, которая может быть в дальнейшем расщеплена мягким восстановлением. Это приводит к разделению белков, образовавших конъюгат, и облегчает их идентификацию. Образованные при помощи таких же или аналогичных реагентов внутримолекулярные сшивки иногда используют для оценки расстояний между функциональными группами на поверхности белковой глобулы.

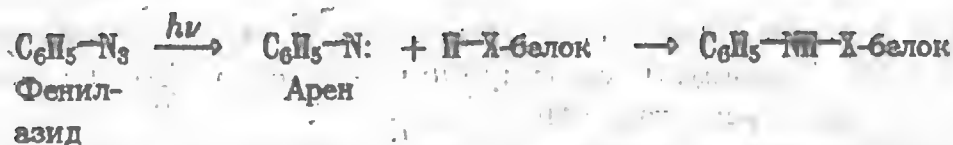
Разумеется, бифункциональные сшивающие реагенты могут содержать и неодинаковые реакционноспособные группы. Это особенно удобно при получении конъюгатов, объединяющих белки с разными функциональными свойствами, например иммуноглобулины и ферменты (обычно пероксидазу или фосфатазу), что необходимо для иммуноферментного анализа. Одним из таких реагентов является N-оксисукцинильный эфир α-малеимидобензойной кислоты:



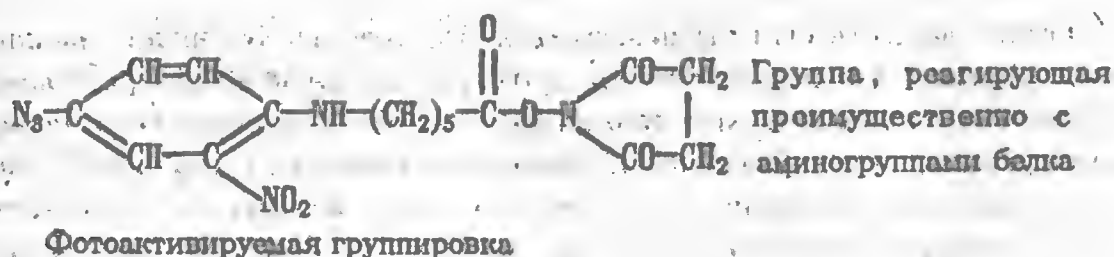
N-Оксисукцинимид-
ный эфир; реагирует
с аминогруппами

Его малеимидная группа способна присоединять сульфгидрильные группы цистеина, а N-оксисукцинильный эфир ацилирует ε-аминогруппы остатков лизина. Поскольку эти реакции протекают в различных условиях, можно избежать образования случайных пар белков.

Получили распространение модифицирующие реагенты, содержащие фотосенсибилизующую фенилазидную группировку. При освещении замещенных фенилазидов УФ-светом с длиной волны 265—275 нм эти, в обычных условиях вполне устойчивые, вещества распадаются с образованием промежуточных аренов — соединений с высокой реакционной способностью. Последние, будучи пространственно обближенными, могут реагировать с различными функциональными группами белка, включая и такие, которые принято считать инертными. В принципе возможна даже реакция нитрена с C-H-группами, однако чаще затрагиваются функциональные группы N-X:



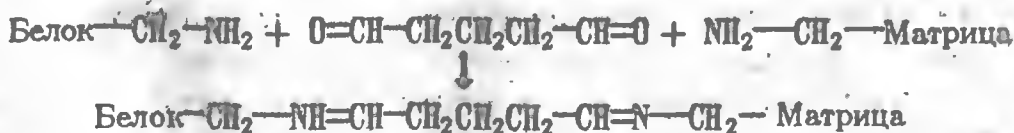
Встраивание фенилазидных группировок в структуру реагента, имеющего еще одну химически активную группу, позволяет сначала модифицировать белок за счет последней. После этого фотоактивация создает в уже модифицированном белке новый высокоактивный центр (арен), способный образовывать ковалентные связи как с соседними молекулами белка (полисахаридами, липидами и т.д.), так и с пространственно близкими группировками внутри той же молекулы. Например, показанный ниже бифункциональный реагент дает возможность присоединить фотоактивируемую группу к аминок группам белка:



9.3.4. Другие области применения химического модифицирования белков

Реакции химического модифицирования позволяют образовывать ковалентные связи между белками и нерастворимой матрицей. Например полисахаридами (агароза и ее производные, в том числе "сефарозы", целлюлоза), органическими полимерами (полиакриламид, поливиниловый спирт "тойоперл"), неорганическими материалами (макропористое стекло и силикагель). Для этой цели используют целый ряд реагентов. Так, при иммобилизации на полисахаридах применяют предварительную активацию матрицы бромцианом, после чего получившийся эфир циановой кислоты образует амидин с ε-аминогруппой белка. Эту реакцию используют и как способ присоединения лигандов к матрице при синтезе аффинных сорбентов (см. гл. 3):

Часто иммобилизацию белков проводят, используя диальдегид (обычно глутаровый диальдегид) для сшивания свободной ε-аминогруппы белка с аминогруппой носителя:



Для большей стабильности иммобилизации малоустойчивые связи —CH=N— гидрируют боргидридом натрия NaBH_4 , переводя их в очень прочные связи $\text{—CH}_2\text{—NH—}$.

Модификация позволяет изменить растворимость белка. Например, присоединение к химотрипсину нескольких гидрофобных полимерных цепочек $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{O—CH}_2\text{CH}_2\text{O—CH}_2\text{CH}_2\text{—O—}$ делает этот фермент растворимым в органических растворителях, что открывает возможность его использования как катализатора в органическом синтезе.

ГЛАВА 10

ФЕРМЕНТЫ

Обмен веществ был бы невозможен без резкого ускорения реакций, на которых он основан, без согласования во времени и пространстве множества биохимических процессов, т.е. без участия биологических катализаторов — ферментов. Биокаталитически ускоряются самые различные превращения, в том числе и такие, которые с точки зрения традиционной химии, казалось бы, не нуждаются в катализе. Например, спонтанно протекающее отщепление воды от угольной кислоты с образованием CO_2 оказывается слишком медленным для регулирования pH крови, и эта, на первый взгляд простая, реакция катализируется специфическим ферментом — карбангидразой.

Как известно, катализаторы не создают той или иной реакции, а лишь ускоряют достижение равновесия, увеличивая скорости как прямого, так и обратного превращения. Как и любые катализаторы, ферменты ускоряют биохимические реакции за счет снижения энергии активации — того энергетического барьера, который отделяет одно состояние системы (исходные соединения) от другого (продукты реакции). При этом, строго говоря, несколько изменяется путь, по которому протекает реакция. Разница в эффективности ферментов и традиционных катализаторов, используемых в химии, казалось бы, чисто количественная. Так, энергия активации распада пероксида водорода на кислород и воду



составляет 18 ккал/моль, мелкодисперсная платина снижает ее до 12 ккал/моль, а фермент каталаза — до 5,6 ккал/моль, что ускоряет реакцию соответственно на 6 и 12 порядков. Столь высокая эффективность ферментов определяет их роль как организаторов биохимиче-

ских процессов. Действительно, благодаря каталитическому действию ферментов в организме становятся возможными такие реакции, которые в отсутствие эффективного катализа были бы неуловимы за разумные времена наблюдения.

Таким образом, ферменты как бы создают, делают осуществимыми многие превращения веществ, не мыслимые в отсутствие биокатализа. Более того, нередко фермент ускоряет один из нескольких термодинамически возможных путей превращения вещества, тем самым избирая его. Следовательно, ферменты выступают не только как ускорители, но и как своеобразные организаторы обменных процессов, чему также способствует и возможность регулирования их активности.

Роль биокатализа была выявлена еще в прошлом веке при изучении процессов брожения. Именно с брожением связаны оба установившиеся в литературе названия биокатализаторов — *энзим* и *фермент*. Из этих синонимов в русскоязычной литературе применяется лишь последний наряду, впрочем, с терминами *энзимология* и *энзиматический*. Ферменты имеют белковую природу, однако обнаружена способность некоторых форм РНК катализировать реакции, т.е. выступать в качестве ферментов. Предполагают, что эта способность молекул РНК сыграла большую роль в эволюции биокатализа до того, как ферментативная функция перешла к белкам — биополимерам, более приспособленным к выполнению этой задачи.

Во многих случаях молекула белка использует в ходе биокатализа небелковые соединения — *кофакторы*, в частности ионы металлов, которые выступают как компоненты каталитического центра фермента. Отделение таких кофакторов, обычно связанных с белком нековалентно, приводит к *апоферментам*, комплекс же фермента и кофактора носит название *голофермента*.

10.1. СИСТЕМАТИКА ФЕРМЕНТОВ

Каждая из примерно 2—3 тыс. реакций обмена в клетке катализируется своим ферментом; следовательно, даже без учета видовых различий существует не менее 2—3 тыс. ферментов. Это число значительно вырастет, если учесть, что реакции одного и того же типа могут катализироваться ферментами различной природы, а также рассматривать ферменты, вовлеченные в передачу сигналов и процессы, свойственные многоклеточным (например, ферменты системы свертывания крови). Вероятно, общее число видов ферментов приближается к десяти тысячам.

Для строго обоснованной классификации столь большого числа ферментов пока недостаточно данных. Рациональной была бы система-

тика, основанная на эволюционных соотношениях между ферментами, глубоком знании их структурных и функциональных особенностей. Это позволило бы объединять в таксоны соответствующих рангов ферменты, возникшие в ходе эволюции одного предшественника. Такая систематика в настоящее время создается для некоторых групп ферментов, в частности для протеиназ.

Однако для практического применения систематики, базирующейся на эволюционных предпосылках, требуется не только предварительное изучение множества родственных ферментов, но и получение большого объема данных о свойствах и, главное, структуре классифицируемого фермента, на что трудно рассчитывать на первых этапах исследования. Ввиду этого принятая официально классификация ферментов использует в качестве основного отличительного признака их *субстратную специфичность, характер проводимых или реакций*, т.е. именно то свойство, которое определяется первым при обнаружении и выделении фермента. Этот признак практически удобен, однако следует учитывать, что он может объединять ферменты различного происхождения, структуры и даже механизма действия.

Международная классификация ферментов (КФ) разделяет ферменты в соответствии с *типом катализируемых или реакций* на следующие шесть классов.

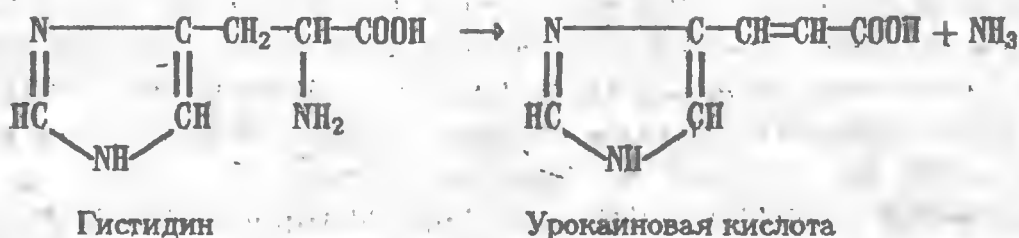
Оксидоредуктазы. К этому классу принадлежат все ферменты, катализирующие *окислительно-восстановительные реакции*. Субстрат, подвергающийся окислению, рассматривают как донор водорода, поэтому к ферментам данного класса нередко применяют термин *дегидрогеназа*, хотя это название отражает только одно из двух возможных направлений реакции. Термин *оксидаза* употребляют только в тех случаях, когда O_2 выступает как *непосредственный акцептор водорода*.

Трансферазы. Ферменты этого класса *переносят ту или иную группу от одного соединения к другому*. К их числу принадлежат, например, *киназы* — ферменты, переносящие фосфорильный остаток АТР на различные субстраты, *аминотрансферазы (трансаминазы)*, переносящие *аминогруппу аминокислот на кетокислоты*.

Гидролазы. Эти ферменты можно рассматривать как *трансферазы, переносящие ту или иную группировку на молекулу воды*. Выделение их в особый класс оправдано чрезвычайно широкой распространенностью гидролаз, вовлеченных, в частности, в процессы деградации биополимеров. Известны гидролазы, катализирующие гидролиз $C-O$, $C-N$, $C-S$, $O-P$ и ряда других связей. Иногда один и тот же фермент способен катализировать гидролиз связей разной природы. Так, некоторые *протеиназы*, расщепляющие пептидные связи в белках, могут даже с большей эффективностью гидролизовать сложные эфиры, выступая

как эстеразы. Выбор термина *протеиназа* в таких случаях основан на представлениях о физиологической роли данного фермента и, следовательно, о характере его природного субстрата.

Лиазы. К ним относят ферменты, разрывающие связи C—C, C—O, C—N и некоторые другие путем элиминирования соответствующей молекулы с одновременным образованием двойной связи. В обратной реакции лиазы катализируют присоединение молекул воды, аммиака и т.д. по двойной связи. Таков, например, гистидин-аммиак-лиаза — фермент, отщепляющий аммиак от гистидина с образованием ненасыщенной урокаиновой кислоты:



Изомеразы. Ферменты этого типа катализируют *геометрические* или *структурные перестройки*, *изомеризации* в пределах одной молекулы. К ним, в частности, относятся *рацемазы*, *таутомеразы*, *циклоизомеразы*. В качестве примера укажем на рацемазу лактама лизина, катализирующую взаимный переход L- и D-изомеров этого соединения (см. гл. 1), триозофосфатизомеразу, катализирующую взаимопревращение фосfogлицеринового альдегида и диоксиацетонфосфата.

Лигазы (синтетазы). К этому классу относятся ферменты, катализирующие *соединение двух молекул, сопряженное с гидролизом АТФ*. Они играют ключевую роль в процессах биосинтеза, обеспечивая за счет энергии гидролиза АТФ протекание таких реакций, которые сами по себе были бы термодинамически невыгодными. Примером могут служить *аминоацил-тРНК-синтетазы*.

Каждый из перечисленных шести классов ферментов разбивают (опять-таки по признаку специфичности) на подклассы и подподклассы, которым присваиваются порядковые номера в соответствии с Международной классификацией. Например, гидролазы, расщепляющие эфиры карбоновых кислот, относятся к классу 3 (гидролазы), подклассу 3.1 (ферменты, действующие на сложноэфирные связи) и подподклассу 3.1.1 (гидролазы эфиров карбоновых кислот). Конкретный фермент внутри подподкласса получает свой порядковый номер. Так, липаза, гидролизующая триацилглицерины, имеет номер 3.1.1.3.

При анализе способа действия ферментов прибегают к ряду упрощений, в определенной мере отражающих существенные черты этого процесса. Прежде всего учитывают, что с субстратом непосредственно контактирует не вся молекула фермента, а лишь ее часть — *активный центр*. Последний не может быть очерчен строго определенными границами, поскольку каждый его компонент так или иначе взаимодействует с другими участками молекулы белка. Эти взаимодействия обычно весьма существенны для каталитического механизма, изменяя реакционную способность функциональных групп активного центра, фиксируя их в структуре белковой глобулы или создавая благоприятствующее катализу специфическое микроокружение. Таким образом, понятие *активный центр* является в определенном смысле абстракцией, которая отражает существенные особенности фермента, но в то же время как бы огрубляет описание катализа.

Упрощая картину далее, активный центр подразделяют на *зону связывания субстрата* и собственно *каталитический центр*. При этом предполагается, что зона связывания ответственна за формирование комплекса фермент — субстрат (так называемого комплекса *Михаэлиса*), за выбор субстрата, его закрепление и правильную ориентацию относительно каталитического центра. Функциональные группы каталитического центра непосредственно участвуют в превращении субстрата. И это упрощение полезно, если не забывать о его относительности, условности. В реальных фермент-субстратных комплексах группы каталитического центра обычно используются для связывания субстрата, а белковые структуры, образующие зону связывания, нередко участвуют в динамических процессах, вмешиваясь в каталитический механизм.

Условность понятия *активный центр* подчеркивается и тем, что последний не удается физически отделить от остальной части молекулы фермента. На рубеже 50—60-х годов появлялись сообщения об удачном "вырезании" активных центров из ферментов, в частности протеиназ. Все они, однако, оказались результатом экспериментальных ошибок. С установлением пространственного строения множества ферментов стало ясно, что, как правило, их активные центры формируются из аминокислотных остатков, далеких друг от друга по последовательности аминокислот, но сближающихся при образовании третичной структуры.

Например, в активном центре пепсина ключевая роль принадлежит остаткам аспарагиновой кислоты 35 и 215, которые сближаются при свертывании полипептидной цепи, состоящей из 321 аминокислотного

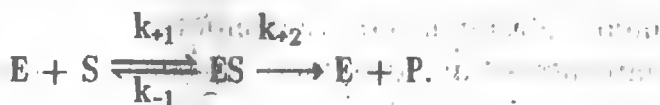
остатка, в пространственную структуру. Очевидно, что при попытке "вырезать" из белковой глобулы те участки последовательности, которые включают компоненты активного центра, получилось бы крайне неустойчивое образование, состоящее из нескольких пептидных фрагментов, а главное, было бы утрачено специфическое окружение функциональных групп каталитического центра, которое определяет их химические особенности.

В то же время структуру фермента в целом нельзя считать неприкасаемой. Молекулы многих ферментов способны противостоять довольно значительным повреждениям, в том числе отдельным разрывам полипептидных цепей, адаптировать целый ряд замен аминокислотных остатков другими; иногда удается заметно уменьшить их размеры без утраты активности. Принципиально возможно и получение относительно небольших каталитических активных структур, при том, однако, непременно условии, что они сохраняют стабильность пространственного строения, т.е. будут соответствовать по размерам и стабильности по меньшей мере рангу домена.

10.3. ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Основы кинетики ферментативных реакций были заложены Л.Михаэлисом и М.Ментен еще в 1913 г. Предложенное ими уравнение, связывающее скорость реакции с концентрациями фермента и субстрата, в дальнейшем преобразовывалось, однако подход в принципиальных чертах сохранился и за уравнением остались эти имена.

Согласно модели Михаэлиса—Ментен, фермент E и субстрат S взаимодействуют со скоростью, характеризуемой константой k_{+1} , образуя фермент-субстратный комплекс ES, получивший название *комплекс Михаэлиса*. Этот комплекс, в котором субстрат, присоединенный к ферменту нековалентными связями, еще сохраняет свою химическую природу, распадается с константой скорости k_{-1} на фермент и субстрат, но может и превратиться в продукт (или продукты) P, высвободив фермент E, со скоростью, характеризуемой константой k_{+2} :



Как правило, фермент-субстратный комплекс ES чаще распадается на исходные компоненты, чем превращается с образованием продукта реакции P, т.е. $k_{+1} \gg k_{+2}$. Конечно, именно превращение субстрата в продукт представляет главный интерес при изучении ферментативных

реакций. Накоплением продукта в единицу времени и определяется скорость реакции.

При выводе уравнения Михаэлиса—Ментен необходимо прежде всего найти зависимость концентрации фермент-субстратного комплекса от концентраций фермента и субстрата, поскольку скорость образования продукта пропорциональна концентрации комплекса ES. Скорость образования ES равна $k_{+1}[E][S]$, скорость же его распада определяется суммой двух процессов: диссоциации фермент-субстратного комплекса на компоненты со скоростью $k_{-1}[ES]$ и его распада с образованием продукта со скоростью $k_{+2}[ES]$.

Итак, скорость распада комплекса ES по двум путям равна сумме этих скоростей $(k_{-1} + k_{+2})[ES]$. Кинетика Михаэлиса—Ментен применима к уже установившимся, стационарным, процессам, когда скорости образования и распада комплекса Михаэлиса равны, т.е. сохраняется его постоянная концентрация. Для такого процесса справедливо равенство

$$k_{+1}[E][S] = (k_{-1} + k_{+2})[ES],$$

преобразуя которое получим $[ES] = \frac{k_{+1}[E][S]}{k_{-1} + k_{+2}}$.

Дробь $\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$ называют константой Михаэлиса K_m . Легко видеть, что она характеризует соотношение скоростей распада (числитель) и образования (знаменатель) комплекса Михаэлиса ES. Если k_{+2} мала по сравнению с k_{-1} , т.е. распад комплекса на исходные компоненты — фермент и субстрат — оказывается значительно вероятнее, чем его распад с образованием продукта P, величиной k_{+2} можно пренебречь и константа Михаэлиса оказывается равной константе диссоциации субстрата:

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_s.$$

Как уже отмечалось, это соотношение часто оказывается справедливым, поэтому константу Михаэлиса K_m нередко приравнивают K_s . Следует, однако, помнить об условности такого упрощения. Заменяя дробь в знаменателе предыдущего уравнения на K_m , получаем

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m}.$$

Заметим, что в приведенное уравнение входят текущие концентрации свободного фермента и субстрата, которые, строго говоря, не со-

падают с их начальными концентрациями, гораздо легче поддающимися определению. Впрочем, различиями в начальной $[S_T]$ и текущей концентрациях субстрата можно пренебречь, приняв $[S_T] \approx [S]$, поскольку уравнение Михаэлиса—Ментен справедливо только для небольших степеней превращения субстрата (о чем нельзя забывать, определяя активность ферментов). Напротив, текущая концентрация фермента существенно отличается от его полной концентрации $[E_T]$ вследствие связывания большей или меньшей доли молекул фермента в комплекс Михаэлиса:

$$[E] = [E_T] - [ES].$$

Подставляя это выражение для текущей концентрации фермента в приведенное выше уравнение, после преобразований получаем

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_m + [S]}.$$

Это уравнение описывает зависимость концентрации фермент-субстратного комплекса от исходных концентраций фермента и субстрата. Так как скорость образования продукта реакции V равна $k_{+2}[ES]$, то

$$V = \frac{k_{+2} [E_T][S]}{K_m + [S]}.$$

Уравнение Михаэлиса—Ментен

Следует иметь в виду, что это уравнение определяет начальную скорость стационарной реакции V_0 , индекс "0" опущен для упрощения. Из выведенного уравнения следует, что скорость реакции пропорциональна общей концентрации фермента, тогда как ее зависимость от концентрации субстрата оказывается значительно более сложной.

Рассмотрим, как выглядит эта зависимость в наиболее характерных случаях. Напомним, что

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}},$$

и если $k_{+2} \ll k_{-1}$ (что наблюдается достаточно часто), то в первом приближении $K_m \approx K_s$, иначе говоря, константа Михаэлиса равна константе диссоциации фермент-субстратного комплекса — "субстратной константе".

1. Если концентрация субстрата много меньше K_m , т.е. $[S] \ll K_m$ (случай, соответствующий действительно низкой концентрации субстрата или плохому его связыванию ферментом — большому значению K_m), то величиной $[S]$ в знаменателе уравнения Михаэлиса—Ментен можно пренебречь и скорость реакции оказывается пропорциональной концентрации и субстрата, и фермента, а само уравнение приобретает вид

$$V = \frac{k_{+2}}{K_m} [E_T] [S].$$

Это выражение соответствует уравнению скорости бимолекулярной реакции. Дробь $\frac{k_{+2}}{K_m}$, которая отвечает константе скорости бимолекулярной реакции, иногда называют бимолекулярной константой скорости и используют соответствующие величины при сопоставлении эффективности действия одготипных ферментов.

2. Если концентрация субстрата много больше K_m , $[S] \gg K_m$ (концентрация субстрата сама по себе велика или фермент хорошо связывает субстрат, чему соответствует низкая K_m), то величиной K_m в знаменателе можно пренебречь и скорость реакции $V = k_{+2}[E_T]$ оказывается пропорциональной концентрации фермента, а от концентрации субстрата не зависит. Иными словами, фермент оказывается насыщенным субстратом, свободного фермента в реакционной смеси нет. Стоит обратить внимание на то, что концентрация субстрата в ферментативных реакциях важна не сама по себе, а в сопоставлении с константой Михаэлиса, характеризующей соответствие данного субстрата ферменту.

Сказанное иллюстрирует рис. 10.1. При небольших концентрациях субстрата скорость реакции пропорциональна его содержанию в реакционной смеси, затем наблюдается все возрастающее отклонение зависимости от линейной и, наконец, при концентрациях субстрата, значительно превышающих K_m , зависимость скорости реакции от концентрации субстрата практически исчезает, причем сама скорость достигает максимального (при данной концентрации фермента) значения

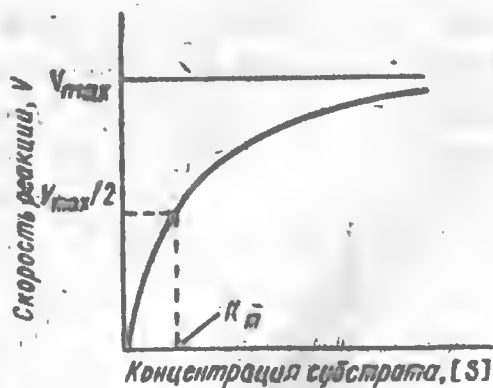


Рис. 10.1. Зависимость скорости V катализируемой ферментом реакции от концентрации субстрата $[S]$

$$V_{\max} = k_{+2}[E_T].$$

Следовательно, $V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$. Это другая форма уравнения Михаэлиса—Ментен.

3. Если концентрация субстрата равна константе Михаэлиса, то $K_m + [S] = 2[S]$ и $V = V_{\max}/2$.

Приведенное соотношение показывает физический смысл константы Михаэлиса для пары фермент—субстрат: она численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции достигает половины максимальной величины.

Необходимо иметь в виду, что кинетика Михаэлиса—Ментен справедлива для многих, но не для всех реакций, катализируемых ферментами. Существенные отклонения от нее обнаруживают, в частности, ферменты, активность которых возрастает с увеличением концентрации субстрата.

Величины $V_{\max}$ и K_m очень важны для характеристики ферментных реакций; разработан ряд приемов их определения. Наиболее популярен способ расчета данных в соответствии с преобразованным уравнением Михаэлиса—Ментен — так называемый *метод двойных обратных величин*, предложенный Г. Лайнуивером и Д. Берком. Уравнение Михаэлиса—Ментен преобразуют так, чтобы оно выражало величину, обратную скорости реакции $1/V$ (т.е. время, необходимое для превращения определенного количества субстрата) в функции обратной концентрации субстрата (его разбавления) $1/S$:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}.$$

В такой форме уравнение Михаэлиса—Ментен эквивалентно уравнению прямой вида $y = ax + b$, где $y = 1/V$, $x = 1/S$,

$$a = \frac{K_m}{V_{\max}}, \quad b = \frac{1}{V_{\max}},$$

т.е. описывает прямую, отсекающую отрезки на координатных осях (рис. 10.2). Если при возрастании концентрации субстрата до очень высоких значений $1/[S]$ стремится к нулю, то $1/V$ оказывается равным $1/V_{\max}$. Таким образом, измерив отрезок, отсекаемый прямой на оси $1/V$, можно вычислить $V_{\max}$. Если же $1/V$ равно нулю, то

$$-\frac{1}{V_{\max}} = -\frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]}$$

и K_m оказывается равной $-[S]$.

Известны и другие, в том числе и более удобные для обработки данных, преобразования уравнения Михаэлиса—Ментен, использование которых описано в специальных руководствах. В последнее время расчеты на ЭВМ вытесняют графические методы.

Применение уравнения Михаэлиса—Ментен позволяет количественно характеризовать эффективность действия ферментов, сравнивать их действие на различные субстраты. Как уже говорилось, значение K_m с определенными оговорками

позволяет оценить сродство различных ферментов к их субстратам. Величины K_m лежат в весьма широком интервале концентраций, обычно начинаясь с миллимолярных. Встречаются и значительно большие значения K_m , что может быть связано с использованием субстратов, не вполне отвечающих специфичности фермента. Понятно, что для небольших субстратов, например HCO_3^- , нелегко организовать достаточно развитую систему взаимодействия с ферментом, поэтому величины K_m , вероятно, будут высокими.

Константы Михаэлиса становятся значительно ниже, связывание — эффективнее, если субстрат является протяженным и с ним возможно установление большого числа нековалентных контактов. Так, панкреатическая эластаза (фермент, природными субстратами которого являются белки или пептиды) весьма слабо связывает простейший модельный субстрат — метиловый эфир ацетил-L-аланина. K_m составляет в этом случае 170 мМ. С удлинением пептидной цепи K_m быстро понижается, связывание улучшается. Так, для метилового эфира ацетил-аланил-аланина K_m равна 22 мМ, для метилового эфира ацетил-аланил-аланил-аланина — 0,4 мМ.

Впрочем, не следует думать, что в процессе эволюции ферментов действуют факторы, направленные на постоянное понижение K_m и улучшение связывания субстратов. По-видимому, достигается оптимальное связывание, характерное для каждой пары фермент—субстрат. В клетке субстраты многих ферментов содержатся в концентрациях,

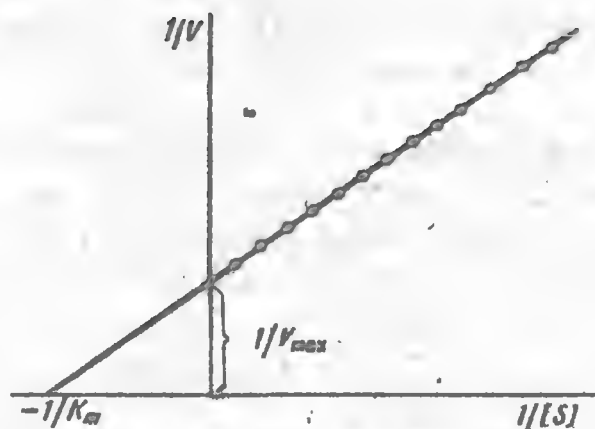


Рис. 10.2. Зависимость величины, обратной скорости реакции $1/V$ (время, затрачиваемое на превращение единицы вещества), от величины, обратной концентрации субстрата $1/[S]$ (разведение):

$-1/K_m$ — отрезок, отсекаемый на оси x ;
 $1/V_{max}$ — отрезок, отсекаемый на оси y

существенно меньших K_m , а следовательно, ферменты не работают в режиме насыщения. Таким образом, для природных систем типична ситуация, когда скорость ферментативной реакции зависит от концентрации субстрата и повышение последней не требует непременно усиления биосинтеза фермента.

А. Фершт и сотрудники, изучая свойства тирозил-РНК-синтетазы, обратили внимание на то, что K_m для одного из субстратов — АТР — равна 2,5 мМ, что на несколько порядков выше констант диссоциации, известных для комплексов АТР с другими белками. Так, K_m миозина по АТР равна 10^{-10} мМ. Совершенно очевидно, что прочное связывание такой крупной молекулы, как аденозинтрифосфат, способной образовывать целую сеть нековалентных связей с белком, вполне осуществимо. Эта возможность не реализована в тирозил-тРНК-синтетазе не потому, что фермент несовершенен. Видимо, прочное связывание АТР с участием большого числа фермент-субстратных контактов привело бы к жесткой системе, в которой перемещения субстрата относительно каталитического центра были бы крайне затруднены, что снизило бы эффективность катализа. К тому же такое "совершенство" излишне, поскольку внутриклеточная концентрация АТР близка к 2—3 мМ, а значит, "идеальный" фермент с лучшим связыванием вряд ли получил бы серьезный выигрыш за счет снижения K_m .

Важной характеристикой эффективности действия фермента является константа k_{+2} , описывающая распад фермент-субстратного комплекса с образованием продукта реакции. Как было показано выше, $V_{\max} = k_{+2} [E_T]$. Зная общую концентрацию $[E_T]$ (для этого необходимо не просто знать концентрацию белка в растворе, а определить, пользуясь специально разработанными методами, концентрацию активных центров), можно рассчитать число молекул субстрата, превращающихся в продукт за единицу времени (1 с) при полном насыщении фермента субстратом. Эта величина, которую называют число оборотов, весьма различна у разных ферментов. Так, для карбангидразы она равна 60 000, для лизоцима — всего лишь 0,5. Следует подчеркнуть, что число оборотов характеризует максимально возможную скорость работы фермента, но не его эффективность в реальных условиях, когда насыщения субстратом нет.

Если механизм превращения ES в продукт более сложен, в частности многостадийен, константу k_{+2} заменяют константой реакции первого порядка $k_{\text{кат}}$.

Более точной мерой эффективности в условиях, приближающихся к реальным, даёт бимолекулярная константа скорости k_{+2}/K_m . Подставляя в это выражение $K_m = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$, получим

$$\frac{k_2 k_{+1}}{k_{+2} + k_{-1}}$$

Анализируя это выражение, можно видеть, что его величина существенно зависит от величины k_{+1} , т.е. от скорости образования комплекса Михаэлиса, а последняя имеет свой предел, определяемый скоростью диффузии частиц в растворе, и не может превышать числа столкновений субстрата и фермента. Действительно, известны ферменты, например карбангидраза и ацетилхолинэстераза, для которых величина $k_{кат}/K_m$ близка к пределу и ограничивается только частотой столкновений фермента и субстрата.

10.4. ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Ингибирование, т.е. полное или частичное подавление активности ферментов при сохранении их первичной и пространственной структуры, — один из важнейших путей регуляции биохимических процессов и в то же время продуктивный способ изучения биокатализа. Различают обратимые и необратимые ингибиторы.

К необратимым относят такие ингибиторы, которые инактивируют фермент, образуя с ним связь, достаточно устойчивую и практически не диссоциирующую в условиях, типичных для его действия. Обычно это ковалентная связь с одной из функциональных групп каталитического центра.

Заметим, что нередко удается подобрать такие условия, при которых инактивирующая группировка отщепляется и фермент реактивируется, однако поскольку эти условия принципиально отличны от тех, при которых происходило ингибирование, последнее все же считается необратимым.

Для примера рассмотрим ингибирование протеолитического фермента папаина, имеющего в каталитическом центре тиоловую группу цистеина, соединениями ртути. Реакция иона двухвалентной ртути с этой тиоловой группой приводит к образованию трудно диссоциирующего меркаптида:



Фермент утрачивает в результате этой реакции активность, и ингибирование в данных условиях необратимо. Однако в присутствии избытка других тиоловых соединений, например меркаптоэтанола, происходит перераспределение ионов ртути между ними и цистеином в

активном центре папаина, вследствие чего последний высвобождается и папаин полностью восстанавливает свою активность:



Такую последовательность превращений используют на практике как способ хранения папаина, предотвращающий его саморасщепление, автолиз. Тем не менее ингибирование папаина ионами ртути рассматривают как необратимое.

С возможностью действия необратимых ингибиторов следует считаться, в частности, при выделении ферментов. Так, ионы ртути, свинца, меди и ряда других тяжелых металлов, блокируя сульфгидрильные группы некоторых ферментов, могут их инактивировать, что требует тщательного их удаления из растворов, а иногда применения комплексонов.

Среди необратимых ингибиторов выделяются *специфические реагенты на функциональные группы каталитического центра ферментов*. Избирательность их действия повышается, если они содержат структуры, способствующие их связыванию в активном центре или, что еще эффективнее, воспроизводят строение переходного фермент-субстратного комплекса. Например, при действии диизопропилфторфосфата на трипсин или другие сериновые протеиназы ингибитор ацилирует активную гидроксильную группу серина в активном центре фермента, однако образующееся соединение, будучи структурным аналогом переходного состояния, устойчиво к дальнейшему гидролизу, поэтому фермент не может регенерироваться и оказывается необратимо ингибированным. Диизопропилфторфосфат необратимо ингибирует также холинэстеразы, что делает его сильным ядом.

Необратимое ингибирование встречается и в природе. Именно так пенициллины инактивируют D,D-карбоксипептидазу — фермент, вовлеченный в биосинтез муреина — полимера, который входит в структуру стенок бактериальных клеток. Пенициллины, в известной мере имитирующие строение субстрата этого фермента, связываются с ним и ацилируют с раскрытием β -лактамного цикла гидроксильную группу серина в активном центре фермента, что вызывает его необратимое ингибирование.

Взаимодействие обратимых ингибиторов с ферментом по схеме



описывается константой ингибирования K_i , которая представляет собой константу диссоциации комплекса фермент-ингибитор EI:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Очевидно, что K_i численно равна концентрации ингибитора, при которой половина молекул фермента оказывается связанной в комплекс фермент—ингибитор.

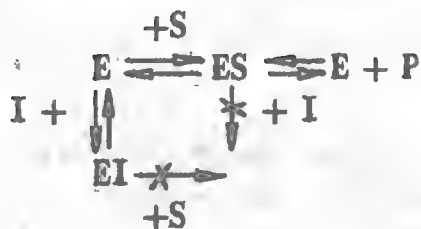
Обратимые ингибиторы в свою очередь подразделяют на конкурентные и неконкурентные. К конкурентным относятся ингибиторы, взаимодействующие с той же зоной поверхности фермента, которая связывает субстрат, а следовательно, способные конкурировать с ним за фермент. Впрочем, участки связывания субстрата и конкурентного ингибитора вовсе не обязательно совпадают — для конкурентных отношений достаточно их частичного перекрывания. Ввиду этого ингибитор химически может быть и не похож на субстрат, поскольку зоны связывания нередко поливалентны. Так, индол и β -нафтол конкурентно ингибируют протеиназу α -химотрипсин, хотя в них трудно усмотреть какую-либо аналогию с пептидами. Речь, видимо, идет об использовании в обоих случаях одного и того же гидрофобного участка химотрипсина.

Уравнение скорости ферментативной реакции в присутствии конкурентного ингибитора несколько сложнее уравнения Михаэлиса—Ментен:

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m(1 + [I]/[K_i])}$$

Введение "кажущейся" константы Михаэлиса $K'_m = K_m(1 + [I]/[K_i])$ приводит уравнение к канонической форме уравнения Михаэлиса—Ментен. Таким образом, присутствие в системе конкурентного ингибитора эквивалентно увеличению константы Михаэлиса, причем степень этого увеличения определяется величиной отношения концентрации ингибитора к константе ингибирования, т.е. к параметру, характеризующему прочность взаимодействия данного ингибитора с ферментом.

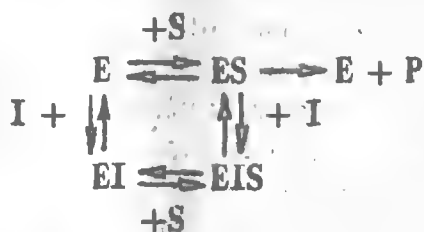
Понятно, что максимальная скорость и соответствующая константа $k_{\text{кат}}$ характеризуют скорость превращения в продукт уже образовавшегося фермент—субстратного комплекса, поэтому на них присутствие конкурентного ингибитора повлиять не может. Изменение же кажущейся константы Михаэлиса учитывает снижение эффективной концентрации фермента, поскольку комплекс фермент—конкурентный ингибитор с субстратом не взаимодействует:



Конкурентное ингибирование распространено в природе, его используют в практических целях для регулирования активности ферментов. По этому механизму действуют, например, природные ингибиторы протеиназ и амилаз, комплементарность которых соответствующим активным центрам так велика и связывание столь сильно, что их действие нередко выглядит как практически необратимое ингибирование из-за очень малых величин констант диссоциации комплексов фермент-ингибитор. Многие лекарственные препараты, нацеленные на подавление нежелательной активности фермента, конструируются как конкурентные ингибиторы, причем подбираются такие их структуры, которые максимально соответствуют строению зоны связывания фермента, чтобы понизить K_1 . Так, аналоги субстратов ренина — протеиназы, вовлеченной в регуляцию давления крови, — которые вместо расщепляемой ферментом пептидной связи $-\text{CO}-\text{NH}-$ содержат устойчивую к гидролизу структуру, например, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$, имеют K_1 порядка $1 \cdot 10^{-9} \text{M}$ и могут иметь терапевтическое значение.

Неконкурентное ингибирование принципиально отличается от конкурентного: в этом случае ингибитор не затрагивает зону связывания субстрата, а присоединяется к ферменту по иному пути, вызывая инактивацию каталитического центра. Поскольку ингибитор и субстрат связываются в таком случае различными участками фермента, ингибитор может присоединяться как к свободному ферменту, так и к фермент-субстратному комплексу, в обоих случаях инактивируя фермент. Именно независимость зон связывания делает невозможной конкуренцию между субстратом и ферментом; следовательно, неконкурентное ингибирование не может быть снято избытком субстрата.

Итак, для неконкурентного ингибирования справедлива следующая схема:



Уравнение скорости ферментной реакции в присутствии неконкурентного ингибитора выглядит следующим образом:

$$V = V_{\max} \cdot \frac{K_i}{[I] + K_i} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Как уже говорилось, характер связывания субстрата ферментом в присутствии неконкурентного ингибитора не изменяется, отсюда и сохранение K_m . Напротив, величина $V_{\max}$ корректируется множителем $K_i/([I] + K_i)$, величина которого тем меньше, чем больше концентрация ингибитора по сравнению с константой ингибирования. Здесь снова концентрация действующего вещества, в данном случае ингибитора, сравнивается с характерной для него константой ингибирования. Уменьшение эффективной максимальной скорости соответствует снижению активности каталитического центра при связывании неконкурентного ингибитора.

Неконкурентное ингибирование может быть следствием нескольких способов взаимодействия фермента и ингибитора. Возможно, ингибитор, связывающийся с функциональными группами каталитического центра, настолько мал, что не вызывает помех связыванию субстрата, — так, например, могут вести себя ионы водорода, протонирующие функциональные группы, которые участвуют в катализе.

Ингибитор может связываться на участке, примыкающем к каталитическому центру, и перекрывать последний, практически не затрагивая зоны связывания субстрата. Такие ситуации особенно вероятны для ферментов с несколькими субстратами, которые связываются каждый на своем участке. Наконец, в особенности для ферментов сложной структуры, возможно, что присоединение ингибитора к участку, отдаленному от каталитического центра, вызовет такие изменения в структуре фермента, которые передадутся в активный центр и нарушат его строение, вызвав инактивацию фермента. Это частный случай аллостерического ингибирования ферментов, весьма распространенного механизма регуляции их активности.

Принципы функционирования, общие для всех ферментов, реализуются в каждом случае в свойственный данному ферменту способ связывания субстрата и каталитический механизм. Если связывание субстратов и обусловленная им специфичность ферментов получили в последние годы достаточно подробное описание, то способ действия каталитического центра практически ни в одном случае не может считаться окончательно установленным, хотя для ряда ферментов предложены механизмы, весьма близкие к реально существующим. Мы рассмотрим данные о механизме функционирования некоторых ферментов, уделяя особое внимание чертам, имеющим общее значение и типичным для биологических катализаторов различной природы.

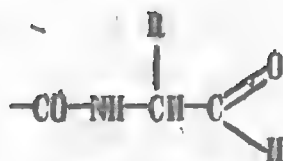
10.5. СЕРИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ

Сериновые протеиназы, названные так по аминокислотному остатку, характерному для их активных центров, широко распространены в природе и вместе с протеолитическими ферментами других классов (*аспартильными, цистеиновыми и металлопротеиназами*) обеспечивают глубокое расщепление белков — основу их катаболизма — и целый ряд реакций ограниченного протеолиза, имеющих регуляторное значение. Известно несколько семейств, объединяющих эволюционно родственные сериновые протеиназы. Для животного мира очень характерны многообразные сериновые протеиназы, принадлежащие к семейству *химотрипсина*, т.е. сходные с химотрипсином (наиболее изученным ферментом этого типа) по пространственной структуре, строению и механизму действия каталитического центра. К этому же семейству относятся некоторые сериновые протеиназы стрептомицетов. Сериновые протеиназы другого семейства — *субтилизины* — особенно характерны для прокариот, но встречаются также в растениях и животных. Известно и третье семейство — *сериновые карбоксипептидазы*, продуцируемые животными, грибами, дрожжами и растениями. Однотипность строения каталитических центров и глубокое сходство механизмов действия ферментов этих семейств, совершенно не похожих друг на друга по пространственной структуре, объясняются, по-видимому, конвергентной эволюцией белков-предшественников.

В дальнейшем изложении обобщены данные о механизме действия сериновых протеиназ.

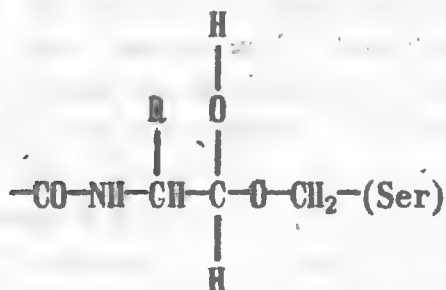
10.5.1. Связывание субстрата

Зона связывания субстрата в протеиназах, участвующая в образовании комплексов с белками или их фрагментами, достаточно протяженна. Обычно с ней могут взаимодействовать 5—8 аминокислотных остатков — по 2—4 по обе стороны расщепляемой пептидной связи. Наблюдать связывание истинных субстратов — пептидов значительной длины — методами рентгеноструктурного анализа не удастся из-за чрезвычайно малых времен существования таких комплексов, в которых субстрат быстро расщепляется. Ввиду этого исследуют комплексы ферментов с аналогами субстратов. Так, подробно описано взаимодействие альдегидопептидов (соединений, в которых С-концевой остаток заменен аминокальдегидом) с ферментом семейства химотрипсина — протеиназой А стрептомицетов:

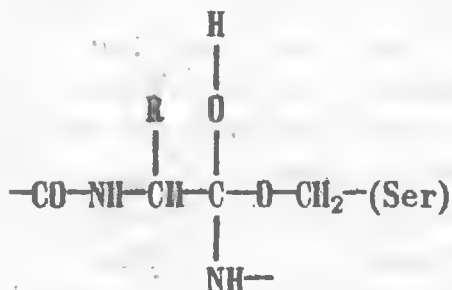


Аминоальдегид

При взаимодействии с сериновой протеиназой альдегидная группа образует *полуацеталь* с гидроксилом серина активного центра. Эта связь служит моделью *переходного фермент-субстратного комплекса*, получающегося при взаимодействии с гидроксильной группой остатка серина в активном центре и карбонила расщепляемой пептидной связи:



Полуацеталь



Продукт взаимодействия
фермента с пептидной
группой

Образующийся весьма стабильный комплекс позволяет описать систему взаимодействий между ферментом и субстратом на участке, предшествующем атакуемой пептидной связи. Взаимодействия фермента и С-концевой части субстрата изучали на других моделях, в частности на комплексах ферментов и природных белковых ингибиторов протеиназ.

На участке, предшествующем атакуемой пептидной связи, фермент формирует с субстратом своего рода антипараллельную β -структуру, образуя три водородные связи. Их дополняют еще четыре водородные связи с функциональными группами каталитического центра. Укладывание пептидного субстрата в зоне связывания сопровождается небольшим смещением окружающих ее участков фермента, а также отщеплением цепочки молекул воды, которые гидратировали функциональные группы свободного фермента, образуя с ними водородные связи.

Система водородных связей между субстратом и ферментом дополняется рядом гидрофобных контактов. Важнейшие из них образует боковая цепь того аминокислотного остатка, карбоксильная группа которого принадлежит атакуемой ферментом пептидной связи. Согласно принятой номенклатуре, такой аминокислотный остаток обозначают P_1 , предшествующий ему — P_2 , далее P_3 , P_4 и т.д., следуя к аминокон-

цевому остатку субстрата. Остаток, чья аминогруппа образует атакующую связь, обозначают P_1' , следующий — P_2' и т.д. Соответствующие этим остаткам участки зоны связывания субстрата обозначают $S_4, S_3, S_2, S_1, S_1', S_2'$.

Протеиназа А стрептомицетов, гидролизующая пептидные связи, в которых участвует карбоксильная группа гидрофобных аминокислот, т.е. близкая по специфичности к химотрипсину, образует с боковой цепью остатка P_1 около 40 нековалентных контактов. Связывание этой гидрофобной группы сопровождается вытеснением молекул воды из гидрофобной впадины S_1 . Столь развитая система нековалентных контактов придает особо важное значение остатку P_1 , природа которого в основном определяет выбор расщепляемой пептидной связи сериновыми протеиназами, иными словами, специфичность этих ферментов, хотя последняя зависит (пусть в меньшей степени) и от соседних аминокислотных остатков.

Интересно, что в образовании гидрофобных контактов с субстратом участвуют остатки аланина, глицина, треонина, глутамина, пролина, выстилающие зону S_1 фермента. На первый взгляд, участие этих, в большинстве своем гидрофильных, аминокислот в построении гидрофобной зоны связывания парадоксально, однако в этом сказывается принципиальная разница в поведении одних и тех же остатков в растворе и при включении в фиксированную пространственную структуру белка. В последней даже метилсесловая группа глицина, будучи как бы отделенной, изолированной от гидрофильных пептидных связей, способна вести себя как гидрофобный элемент. Такие небольшие сами по себе элементы, закрепленные в пространстве водородными связями соседних групп, образуют своего рода гидрофобную мозаику, выстилающую впадину, "карман" в зоне связывания субстрата.

Видимо, такой способ формирования гидрофобных зон даже эффективнее, чем использование для этой цели отчетливо гидрофобных аминокислот с крупными боковыми группами, поскольку зафиксировать последние в поверхностной структуре белка, в частности лишить их способности вращаться, сложнее, чем фиксировать маленький гидрофобный элемент.

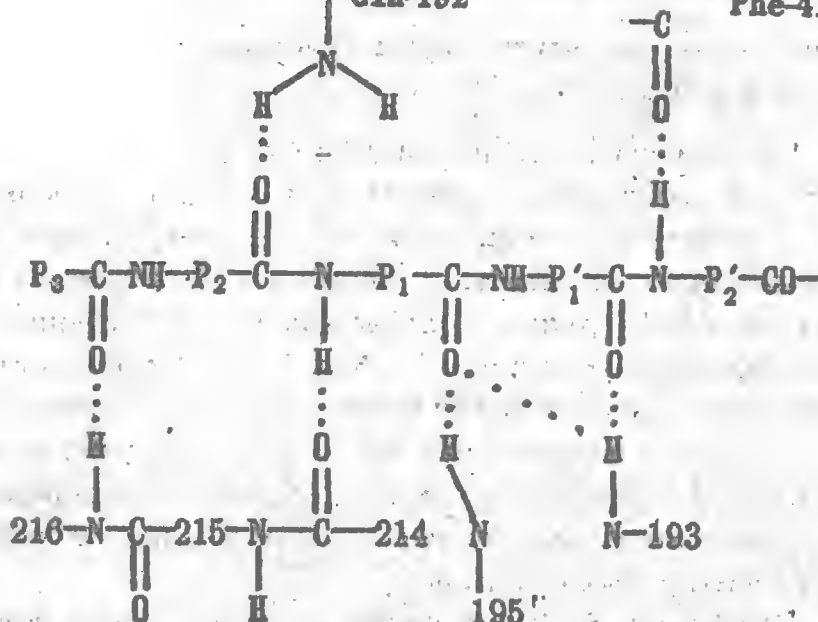
У сериновых протеиназ, специфически расщепляющих пептидные связи, которые образованы карбоксильными группами лизина или аргинина — трипсина и его аналогов, — также реализуются множественные контакты между полипептидной цепью субстрата и ферментом. И в этом случае особенно важно установление системы водородных связей между пептидной цепью субстрата и ферментом:

Аминокислотные остатки фермента

Gln-192

Phe-41

Пептидная цепь
остатков P_3-P_2'
субстрата



Аминокислотные остатки фермента (трипсина)

Связывание остатка P_1 в основном определяется электростатическими взаимодействиями между катионными группами в боковой цепи субстрата $-\text{NH}_3^+$ в случае лизина или гуанидиниевой группой

$\left[\begin{array}{c} -\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ || \\ \text{NH}_2 \end{array} \right]^+$ в случае аргинина — и карбоксилат-анионом остатка

аспарагиновой кислоты, расположенного на дне гидрофобной впадины S_1 (Asp-189, в трипсине) (рис. 10.3). Такому электростатическому взаимодействию благоприятствует изоляция ионной пары от контакта с водой.

Кроме того, оно дополняется системой водородных связей между гуанидо- или аминогруппой субстрата и карбоксилат-ионом Asp-189, а также кислородными атомами ряда $\text{C}=\text{O}$ -групп фермента. Замена остатка Asp-189 на остаток лизина в трипсине, проведенная методами белковой инженерии, радикально изменила специфичность фермента, который перестал гидролизовать пептидные связи аргинина и лизина, но приобрел (правда, слабую) способность расщеплять связи, образованные гидрофобными остатками фенилаланина, лейцина, тирозина, т.е. по специфичности стал близким другому ферменту того же семейства — химотрипсину.

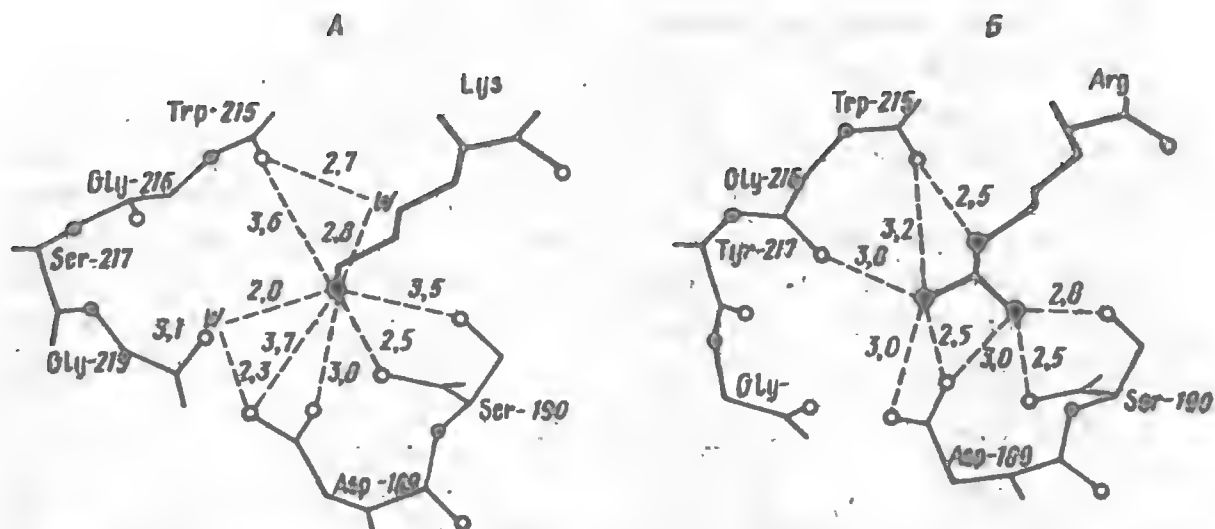


Рис. 10.3. Размещение боковой цепи остатка P_1 субстрата в зоне S_1 трипсина. А - взаимодействия NH_3^+ -группы лизина, Б - гуанидогруппы аргинина:

полыми кружками обозначены атомы кислорода, зачерненными - азота, W - молекулы воды, удерживаемые ферментом; пунктиром показаны водородные связи, цифрами - их длина в ангстремах

Иногда остаток P_1 не столь доминирует в определении специфичности, и больший вес приобретают взаимодействия с ферментом других аминокислотных остатков субстрата. Например, специфичность калликреина — аналога трипсина, вовлеченного в регуляторные механизмы у животных, — определяется присутствием аргинина в положении P_1 и гидрофобного остатка в положении P_2 субстрата и оказывается, таким образом, гораздо более узкой.

При действии протеиназ на нативные белковые субстраты специфичность гидролиза определяется не только и даже не столько последовательностью аминокислот расщепляемого участка, сколько его пространственной, стерической доступностью. Так, погружение всего активного центра калликреина в своего рода впадину за счет удлинения прилегающих к нему пептидных петель фермента делает практически невозможным гидролиз обычных белковых субстратов, даже если они содержат последовательность гидрофобный остаток — аргинин. Калликреин атакует только такой белок, в котором соответствующая его специфичности последовательность расположена на выступе белка-субстрата, комплементарном впадине активного центра фермента. Так достигается очень узкая, практически уникальная специфичность калликреина — фермента, участвующего в отщеплении вазоактивных пептидов от белковых предшественников, но практически не действующего на другие белки.

Отметим еще одну особенность связывания белковых субстратов в активном центре протеиназ. При образовании комплексов с достаточно

длинными пептидами, перекрывающими активный центр; укладка полипептидной цепи в зоне связывания требует, как предполагают, определенного ее "перекручивания", некоторого искажения плоскостной структуры атакуемой ферментом пептидной связи, что создает благоприятные условия для ее перехода из плоской в пирамидальную конфигурацию, близкую к переходному состоянию. Следовательно, уже на стадии образования комплекса Михаэлиса при связывании субстрата подготавливается стереохимический переход, имеющий ключевое значение для эффективного катализа.

Характерные для сериновых протеиназ черты связывания субстрата — множественность взаимодействий, точность ориентации относительно групп каталитического центра и преимущественное связывание конформации, стереохимически приближенной к той, которая существует в переходном комплексе, — типичны для многих ферментов. Необходимо подчеркнуть, что две важнейшие стадии катализа — связывание субстрата и собственно каталитическое превращение, — хотя и рассматриваются раздельно, в действительности слиты в единый механизм.

10.5.2. Каталитический механизм

Топография каталитического центра сериновых протеиназ описана достаточно подробно. Изучение структуры комплексов ферментов этого класса с различными аналогами субстратов и ингибиторами в сочетании с данными по кинетике катализа, химической модификации отдельных групп фермента, метода ЯМР и белковой инженерии привели к следующим представлениям о механизме действия сериновых протеиназ.

В превращении субстратов наибольшая роль принадлежит гидроксильной группе серина-195 (здесь и далее нумерация остатков дается по последовательности наиболее изученного фермента — α -химотрипсина), имидазолу His-57, β -карбоксильной группе Asp-102, а также пептидным группам остатков Ser-195 и Gly-193. Таким образом, в сериновых протеиназах, как и в других ферментах, активный центр собран из аминокислотных остатков, расположенных в совершенно разных участках полипептидной цепи, но сближенных в пространственной структуре фермента (рис. 10.4).

Как правило, компоненты каталитического центра взаимодействуют с соседними группами фермента, что закрепляет их в определенной ориентации и видоизменяет химические характеристики. Например, карбоксильная группа остатка Asp-102 образует с соседями четыре водородные связи, которые стабилизируют ее анионную форму и, как

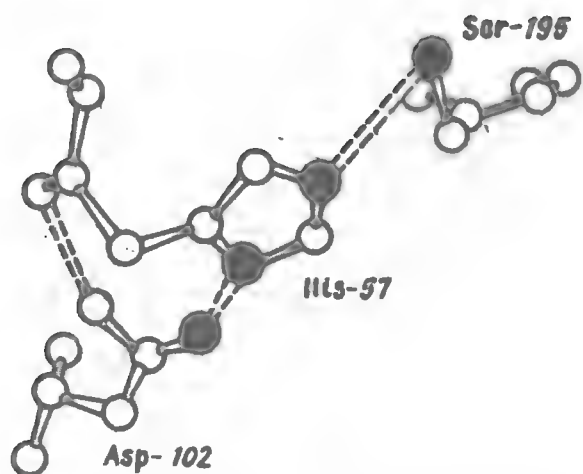


Рис. 10.4. Расположение функциональных групп в каталитическом центре сериновых протеиназ

Показаны компоненты каталитического центра — остатки серина, гистидина и аспарагиновой кислоты; зачернены атомы азота и кислорода, участвующие в механизме катализа. Прерывистыми линиями обозначены водородные связи. Нумерация дана по аминокислотной последовательности химотрипсина; в других сериновых протеиназах эти аминокислоты могут занимать другие места в первичной структуре фермента, но их относительное расположение в пространстве строго сохраняется

Влияние микроокружения на поведение функциональных групп в ферменте весьма существенно, и все же реакционная способность компонентов активного центра сериновых протеиназ *в отсутствие субстрата* не обнаруживает резких различий, которые выходили бы за рамки обычных вариаций в химических свойствах функциональных групп на поверхности белка. Так, сообщения о том, что имидазол His-57 и карбоксил Asp-102 в активном центре белка как бы поменялись свойствами, причем имидазол оказался более кислым, чем карбоксильная группа, оказались ошибочными. Точно так же нельзя думать, что *в свободном ферменте* происходит эстафетный перенос отрицательного заряда от карбоксилат-иона Asp-102 на Ser-195 и гидроксил последнего превращается в гидроксидный ион — чрезвычайно сильный нуклеофил. Такая передача заряда была бы сразу же обесценена реакцией гидроксид-иона с водой:



Напротив, *в фермент-субстратном комплексе* химические свойства участников каталитического процесса, в том числе функциональных

следствие, смещают pK_a этого остатка к 2—3 вместо 3,6 (величины, характерной для обычной β -карбоксильной группы аспарагиновой кислоты). Соседство этого карбоксилат-иона стабилизирует протон на одном из атомов имидазольной группы гистидина — именно на том, который обращен к Asp-102, — и вместе с тем определенную электронную структуру имидазольного кольца His-57. Последнее очень характерно для функциональных групп белка и не имеет аналогий в поведении таких же групп, в частности имидазольной, в небольших молекулах. Окружение функциональных групп в белке *анизотропно*.

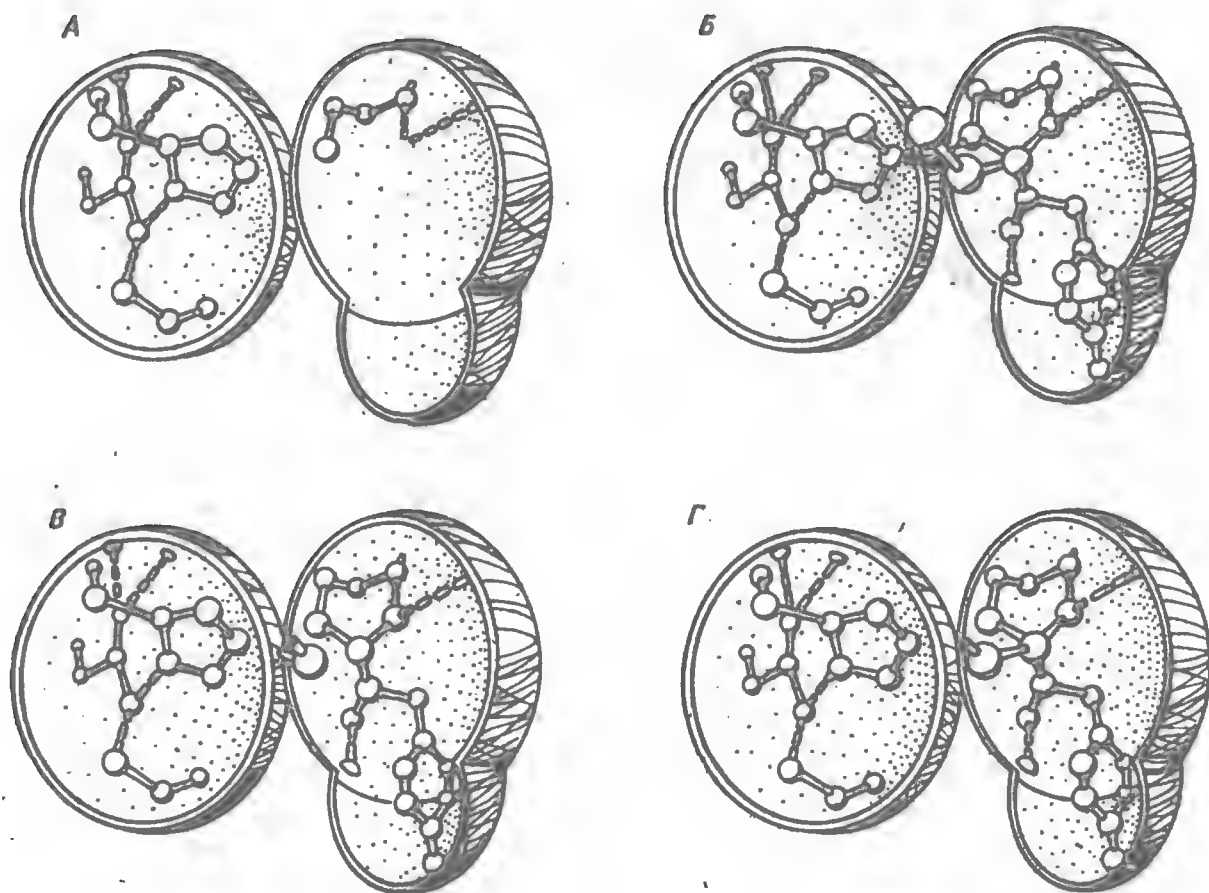


Рис. 10.5. Механизм действия сериновых протеиназ:

А – функциональные группы в активном центре фермента. В левой полусфере – имидазол гистидина, за которым расположен карбоксил остатка аспарагиновой кислоты, фиксированный системой водородных связей, в правой – боковая цепь серина и две водородные связи оксианионной впадины;

Б – в правой полусфере – продукт взаимодействия субстрата (показан тирозин в положении P_1), кислород размещен в оксианионной впадине; протон, покинувший кислород гидроксильной группы серина, перемещается к азоту имидазола и далее – к атому азота расщепляемой пептидной связи;

В – молекула воды разместилась вблизи атома углерода карбонильной группы, причем ее протон переместился к азоту имидазола гистидина;

Г – гидроксильная группа воды присоединилась к углероду карбонильной группы, чем завершилось расщепление пептидной группы

групп каталитического центра, меняются очень существенно, что определяется не только развитой системой нековалентных взаимодействий, охватывающей фермент-субстратный комплекс, но и изоляцией всей системы от воды. По справедливому замечанию М.Дьюара, само связывание фермента и субстрата предполагает как необходимую предпосылку отделение молекул воды, окружающих до реакции субстрат и заполняющих зону активного центра фермента. Вследствие этого каталитическая реакция переносится в совершенно иную среду. Это сообра-

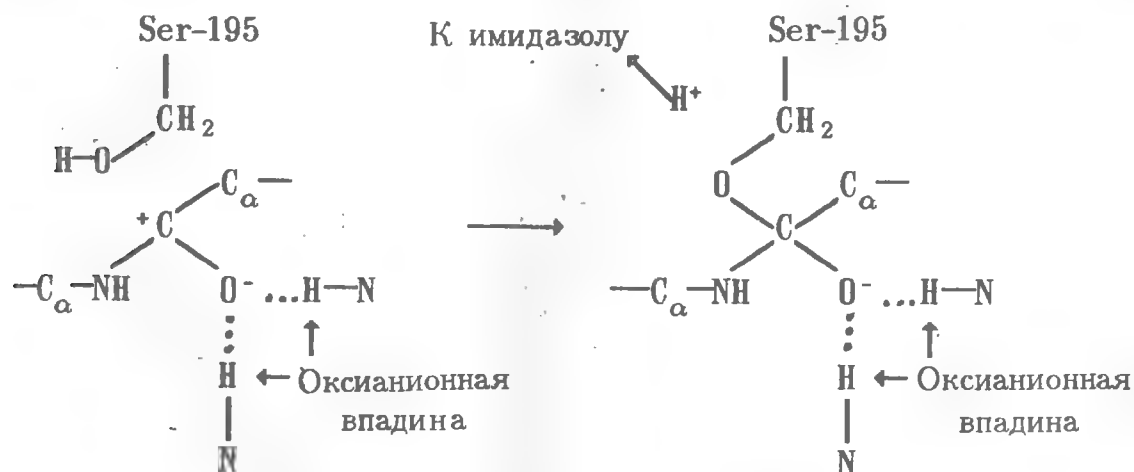
жение еще раз подчеркивает неразрывную связь обеих сторон биокаталитического процесса — связывания и собственно превращения субстрата.

Гипотетический механизм действия сериновых протеиназ может быть описан следующим образом (рис. 10.5). Необходимо учитывать, что происходящие последовательно процессы в действительности могут протекать синхронно.

Связывание полипептидного субстрата в активном центре ставит карбонильную группу атакуемой пептидной связи в такую позицию, что ее кислород оказывается в так называемой *оксианионной впадине*. Образование этим атомом двух водородных связей с соответствующим образом ориентированными N—H-группами, принадлежащими пептидным связям остатков Ser-195 и Gly-193, способствует поляризации связи C=O и ее переходу в $^+C - O^-$; стабилизирует оксианион. Положительный заряд на углероде карбонильной группы за счет точного связывания субстрата ферментом пространственно сближен с кислородом гидроксильной группы серина. Это вызывает поляризацию гидроксильной группы, которая принимает структуру, близкую к $-CH_2-O^- \dots H^+$, что резко усиливает нуклеофильность атома кислорода серина.

Таким образом, в рассматриваемой схеме увеличение нуклеофильности серина происходит под влиянием соответственно ориентированного и поляризованного за счет взаимодействия с ферментом *карбонила субстрата*, причем последний экранирует нуклеофил, защищая его от воды.

Далее образуется ковалентная связь между углеродом субстрата и кислородом субстрата, вероятно, более длинная и менее прочная, чем обычно (рис. 10.5, Б):

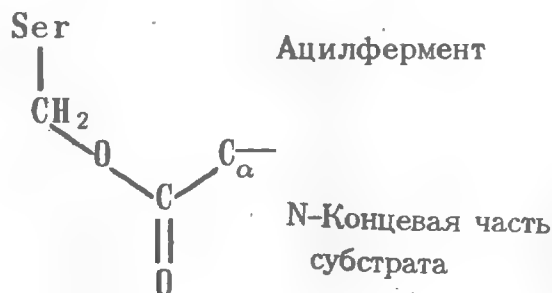


Протон, отщепившийся от гидроксила серина, перемещается по

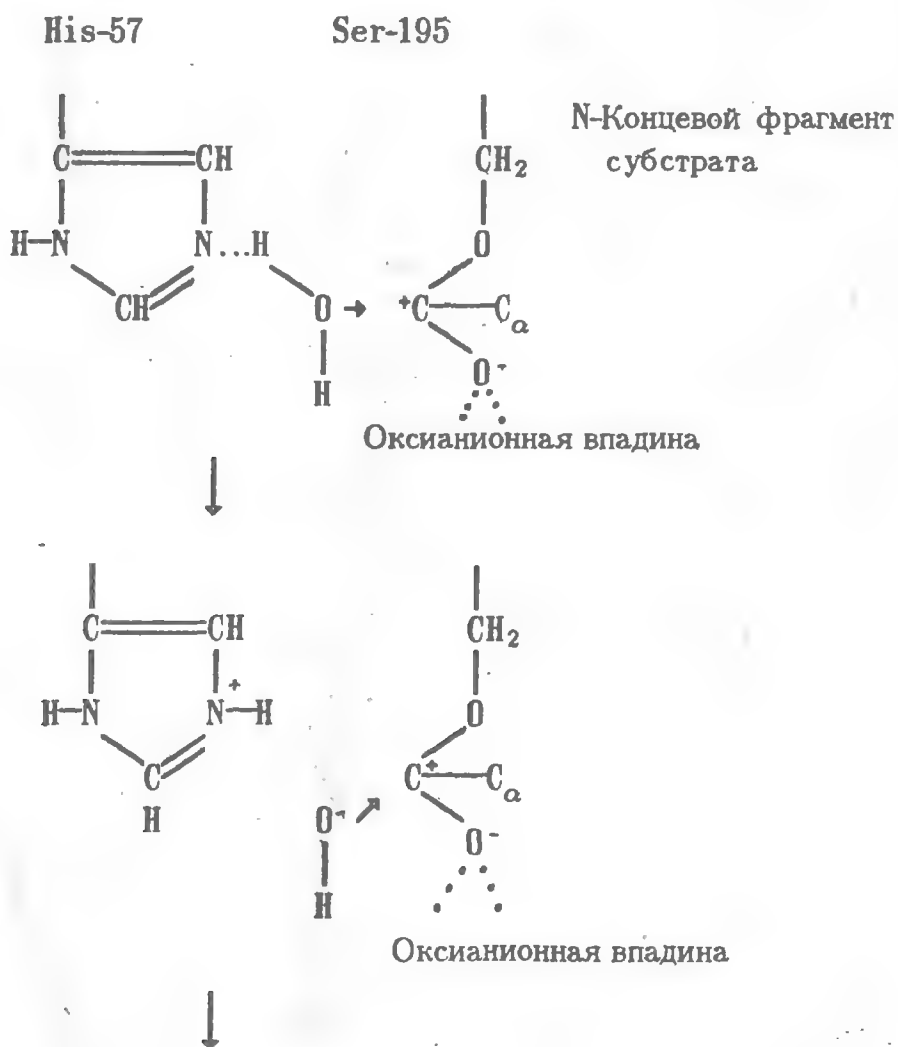
траектории, которая задана имидазольной группой His-57, приближаясь к непротонированному атому азота, а затем переходит к —NH— группе расщепляемой пептидной связи. Как известно, атом азота в пептидных группах практически лишен основных свойств из-за смещения свободной электронной пары, обслуживающей связь C—N , которая носит характер частично двойной. Однако после поляризации карбонильной группы в оксианионной впадине плоскостной характер пептидной связи утрачивается, связь C—N становится простой и атом азота приобретает свойства весьма сильного основания. Ввиду этого протон от имидазольной группы — слабого основания — переходит к группе —NH— , описав своего рода дугу. Связь C—N разрывается и фрагмент пептидного субстрата высвобождается (рис. 10.5, B):

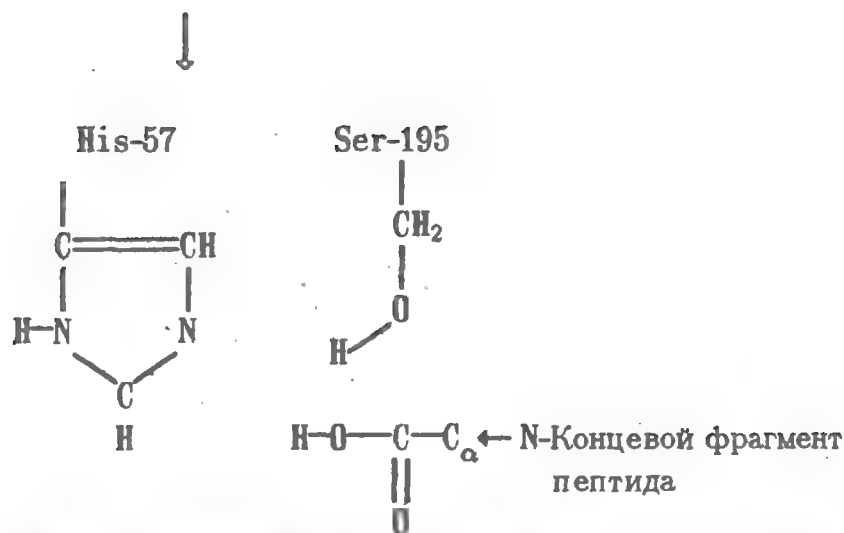


Таким образом, выполнена первая задача катализа — расщеплена пептидная связь и высвобожден C-концевой фрагмент пептида. Оставшаяся часть пептида (от остатка P_1 до аминного конца) пока сохраняет связь с ферментом через остаток серина. По-видимому, эта связь может в определенных условиях стабилизироваться за счет восстановления карбонильной группы, взаимной компенсации положительного и отрицательного зарядов, так что фрагмент пептида образует с ферментом сложноэфирную связь — образуется так называемый *ацилфермент*:



Действительно, при действии сериновых протеиназ на некоторые аналоги субстратов удается наблюдать, а иногда и выделить достаточно устойчивый ацилфермент. При гидролизе обычных субстратов, однако, такая стабилизация, видимо, не обязательна и гидролизу подвергается производное с поляризованной карбонильной группой. Во всяком случае, после ухода С-концевого фрагмента пептида молекула воды занимает освободившееся место и располагается так, что образует водородную связь с азотом имидазольной группы, тогда как ее атом кислорода оказывается сближенным с положительно заряженным атомом углерода карбонильной группы. Это приводит к отщеплению протона, присоединяющегося к имидазолу, и образованию гидроксильного иона, легко взаимодействующего с положительно заряженным углеродом карбонила. Протон мигрирует к кислороду серина, в результате чего с расщеплением связи C—O восстанавливается гидроксильная группа активного центра и высвобождается N-концевой фрагмент пептида, чем и завершается каталитический цикл (рис. 10.5, Г):

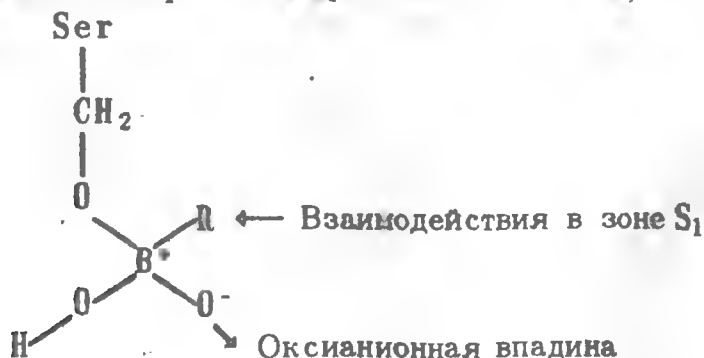




Эта стадия реакции протекает в целом аналогично первой, однако роль гидроксильной группы серина переходит к молекуле воды.

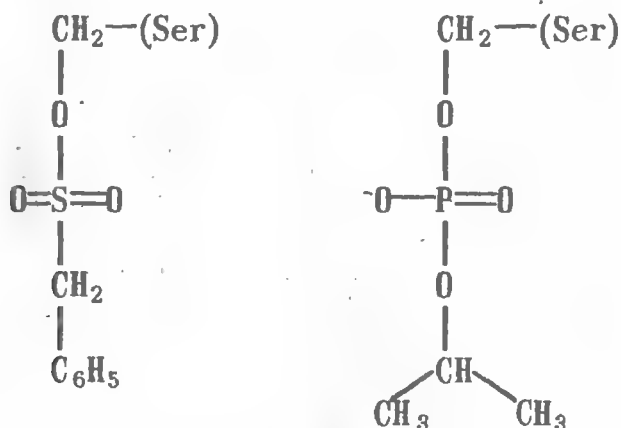
Если принять, что происходит стабилизация промежуточного продукта и образуется ацилфермент, механизм гидролиза последнего окажется практически таким же. Следует лишь предположить поляризацию $\text{C}=\text{O}$ -связи в сложноэфирной группе ацилфермента за счет водородных связей в оксианионной впадине, что приведет к появлению положительного заряда на атоме углерода карбонильной группы, т.е. к образованию того же самого промежуточного продукта, судьба которого прослежена выше.

Важнейшей чертой рассмотренного механизма действия сериновых протеиназ, по-видимому, типичной и для других ферментов, является стабилизация тетраэдрического переходного состояния в фермент-субстратном комплексе. Характерно, что весьма эффективными ингибиторами сериновых протеиназ являются алкилборные кислоты, в которых предсуществует тетраэдрическая конфигурация заместителей — трех гидроксильных групп и алкильного остатка, — имитирующая структуру переходного состояния. Особенно эффективны производные борнатного аналога фенилаланина, который связывается в участке S_1 за счет бензильной группы и в каталитическом центре; соответствующая константа ингибирования K_i составляет 10^{-8} М:



Альдегидопептиды — ингибиторы сериновых протеиназ, как упоминалось, образуют с серином активного центра ковалентную полуацетальную связь — структуру, аналогичную в известной мере ацилферменту. При этом свободный гидроксил связывается в оксианионной впадине так же, как это происходит с кислородом карбонильной группы в фермент-субстратном комплексе.

Хорошо известны ингибиторы сериновых протеиназ, которые при взаимодействии с ферментом проходят первую фазу каталитического процесса и образуют ацилфермент. Некоторые такие производные гидролизуются с измеримой скоростью, однако другие, в частности производные арилсульфотриглицеридов и ряд фосфорорганических соединений, оказываются стабильными, что приводит к необратимому ингибированию фермента. Ниже показаны структуры стабильных ацилферментов, получающихся при ингибировании сериновых протеиназ фенолметилсульфонилтриглицеридом (слева) и диизопропилфторфосфатом (справа):



Изложенные выше представления о механизме действия сериновых протеиназ подтверждены методами белковой инженерии. Замена серина активного центра в ряде ферментов этого семейства (при помощи сайт-специфичного мутагенеза) на аланин неизменно приводит к практически полной утрате активности. Замена компонентов каталитического центра в субтилине (протеиназе бацилл) дала следующие результаты. Замена серина Ser-221 (остатка, соответствующего Ser-195 в химотрипсине) аланином снижала активность фермента примерно в 10^6 раз, причем практически весь эффект приходился на снижение каталитической константы $k_{\text{кат}}$, а константа Михаэлиса сохраняла свое значение. Такие же результаты давала замена гистидина каталитического центра аланином. Несколько меньшим, но все же очень значительным, было падение $k_{\text{кат}}$ при замене Asp-32 аланином, $k_{\text{кат}}$ в этом случае составляла $4 \cdot 10^{-6}$ от величины, характеризующей исходный фермент.

Труднее анализировать этим методом роль N—H-групп, образующих оксианионную впадину, так как в химотрипсине и гомологичных ему ферментах обе они принадлежат пептидному скелету. Однако в субтилизине роль одного из компонентов оксианионной впадины выполняет амидная группа аспарагина. Замена этого остатка лейцином снижает эффективность поляризующего действия оксианионной впадины на C=O-группировку субстрата, вследствие чего активность снижается примерно в 10^3 раз, сохраняя тем не менее вполне заметный уровень.

10.6. ЛИЗОЦИМ

Лизоцим относится к классу гидролаз и представляет собой сравнительно небольшой фермент, избирательно гидролизующий гликозидные связи в муреине — сложном биополимере, из которого построены стенки бактериальных клеток. Структурную основу муреина (рис. 10.6) составляют полисахаридные цепи чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмуравовой кислоты, соединенных 1,4-β-гликозидными связями. К карбоксильным группам лактильных остатков N-ацетилмуравовой кислоты присоединены своеобразно построен-

Рис. 10.6. Повторяющееся дисахаридное звено в полисахаридной цепи муреина

К карбоксильной группе лактильного фрагмента N-ацетилмуравовой кислоты (NAM) присоединяются полипептидные мостики, соединяющие полисахаридные цепи. Лизоцим атакует β-гликозидную связь между остатками NAM и N-ацетилглюкозамина (NAG), так что атом кислорода этой связи оказывается у N-ацетилглюкозамина

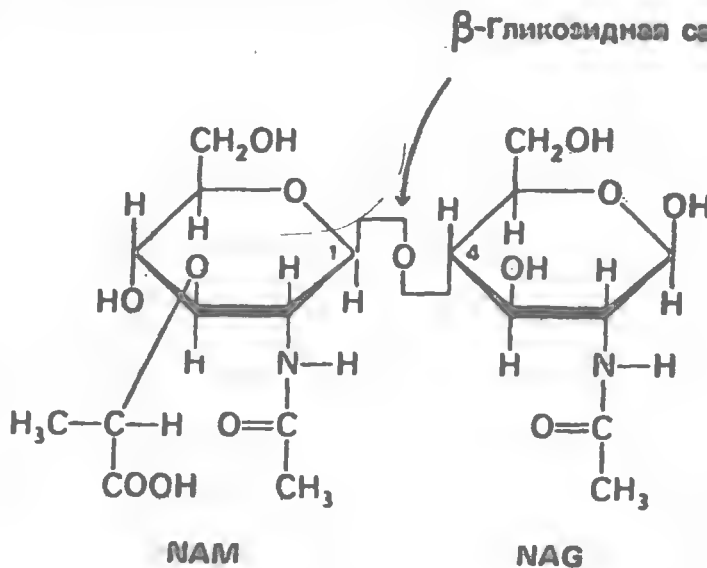


Рис. 10.6. Повторяющееся дисахаридное звено в полисахаридной цепи муреина

К карбоксильной группе лактильного фрагмента N-ацетилмурамовой кислоты (NAM) присоединяются полипептидные мостики, соединяющие полисахаридные цепи. Лизоцим атакует β -гликозидную связь между остатками NAM и N-ацетилглюкозамина (NAG), так что атом кислорода этой связи оказывается у N-ацетилглюкозамина.

ные пептидные цепочки, поперечно соединяющие полисахаридные цепи в протяженную двумерную структуру. Известны лизоцимы животных, содержащиеся преимущественно в секрете слизистых оболочек, которые они защищают от микроорганизмов, лизоцимы бактериофагов, используемые для проникновения в бактериальную клетку и выхода из нее зрелого фага. Наиболее подробно изучен *лизоцим белка куриного яйца*, который и будет рассматриваться далее. Он состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 129 аминокислотных остатков.

Имеющиеся сведения о механизме действия лизоцима основаны преимущественно на данных рентгеноструктурного анализа фермента и его комплексов с аналогами субстрата — олигосахаридами, построенными из N-ацетилглюкозамина.

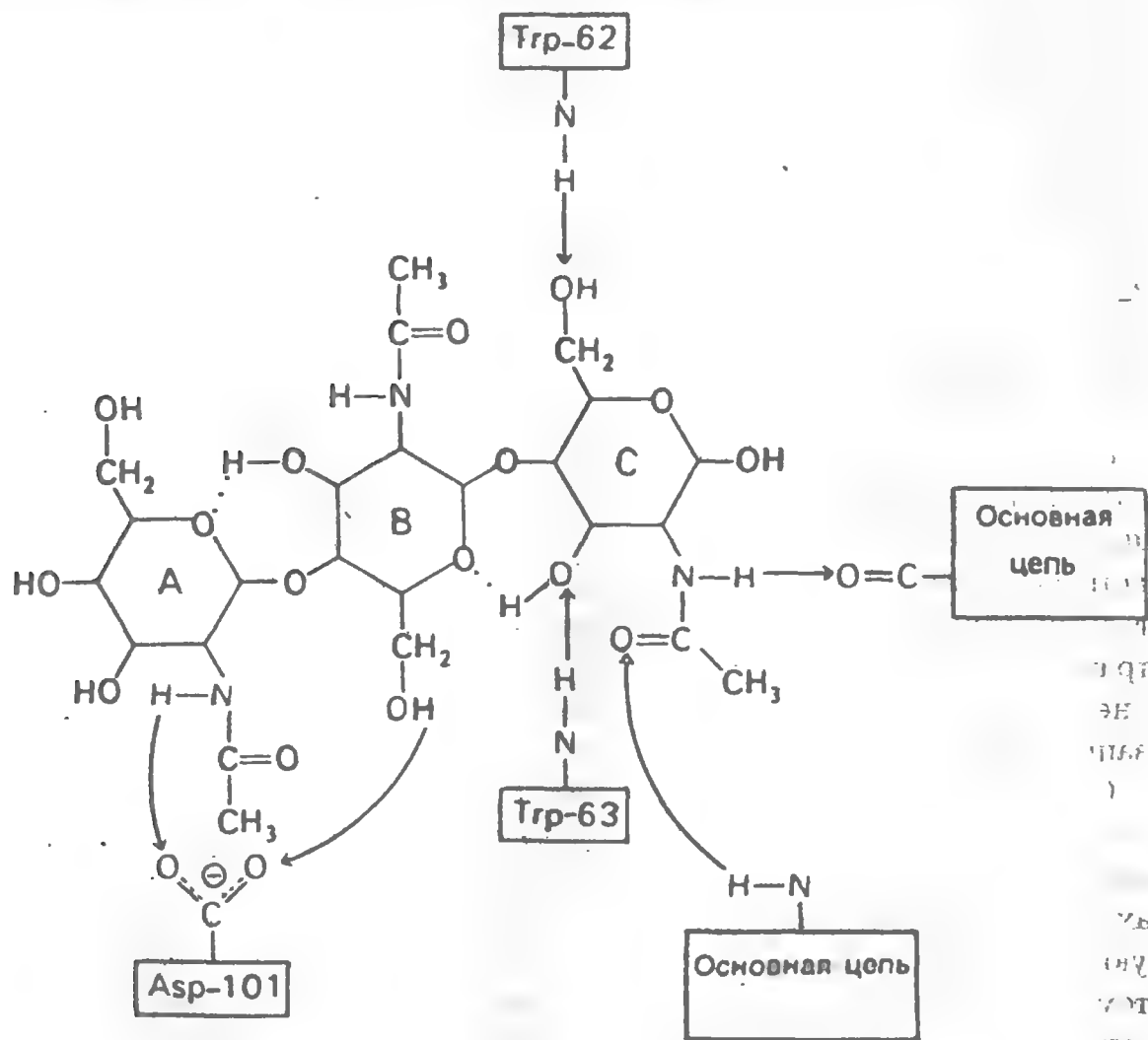


Рис. 10.7. Связывание субстрата в активном центре лизоцима

Показана система водородных связей (обозначены стрелками), обеспечивающих связывание части субстрата — колец А, В, С. Эти связи дополняются ван-дер-ваальсовыми контактами, в частности с индольным кольцом триптофана

Образование комплекса протяженного полисахарида и фермента является результатом *множественных нековалентных взаимодействий* между ферментом и шестью последовательно расположенными моносахаридными звеньями А—В—С—D—E—F, укладывающимися в зоне связывания субстрата (рис. 10.7).

По-видимому, наиболее прочно связывается звено С субстрата, расположенное неподалеку от расщепляемой гликозидной связи. С ним фермент образует четыре водородные связи — две за счет ацетамидной группировки субстрата, которая формирует нечто вроде β -структуры с карбонильной группой остатка 107 и NH-группой остатка 59, и еще две связи за счет NH-групп индольных колец триптофана Trp-62 и Trp-63. Предшествующие звену С звенья А и В образуют с ферментом по одной водородной связи.

Определенную роль в формировании фермент-субстратного комплекса играют и ван-дер-ваальсовы взаимодействия, в частности между кольцом В и остатком Trp-62. Впрочем, мутанты лизоцима, в которых этот остаток заменен на тирозин, фенилаланин или гистидин, обладают даже несколько большей активностью. Характерно, что укладка первых трех звеньев полисахаридной цепи — А, В и С — требует локальных изменений в прилегающих участках фермента. Так, индольное кольцо Trp-62 перемещается на 0,7 Å, освобождая место для плотного укладывания субстрата.

Есть основания полагать, что образование фермент-субстратного комплекса начинается со связывания моносахаридных звеньев А, В и С, вслед за которыми во впадину на поверхности фермента укладываются еще три звена: D, E и F. Непосредственно наблюдать связывание этой части субстрата не удастся, поскольку гексасахарид быстро расщепляется лизоцимом. Однако размещение модели гексасахаридного субстрата на пространственной модели фермента показало, что звенья E и F не только легко укладываются, но и образуют ряд нековалентных взаимодействий в зоне связывания.

Сложнее обстоит дело с остатком D, а именно его β -гликозидная связь с остатком E атакуется ферментом в гексасахариде. Это звено нельзя разместить в зоне связывания фермента в обычной для моносахаридов конформации "кресла" — оно не укладывается в субстратную щель из-за помех, вызываемых слишком близкими контактами атомов C-6 и O-6 этого звена с лизоцимом. Эти помехи, однако, полностью снимаются, если звено D изменит свою конформацию и перейдет в напряженную конформацию "полукресла" (рис. 10.8). Таким образом, связывание субстрата должно благоприятствовать искажению конформации вблизи атома углерода C-1 звена D, который непосредственно участвует в реакции. Характерно, что аналоги субстрата, содер-

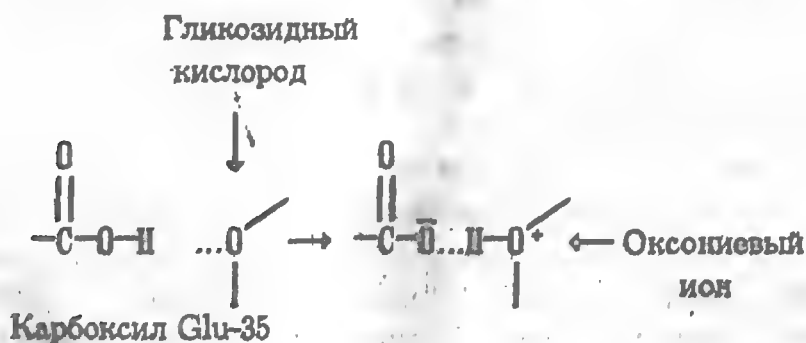


Рис. 10.8. Конформация "полукресла", свойственная шестичленным циклам (в том числе моносахаридам) с двойной связью в цикле

жащие концевой глюколактон, также имеющий конформацию полукресла, очень прочно связываются ферментом и выступают в качестве его ингибиторов.

Предполагают, что дальнейшее действие лизоцима (рис. 10.9) обусловлено сближением гликозидной связи, соединяющей звенья D и E, и карбоксильной группой остатка Glu-35, который входит в активный центр фермента. Эта карбоксильная группа находится в гидрофобном окружении, поэтому ее диссоциация привела бы к энергетически невыгодному образованию отрицательно заряженного карбоксилат-аниона в неполярной среде, где затруднена его гидратация. Как следствие, карбоксильная группа остатка Glu-35 является более слабой кислотой по сравнению с другими карбоксильными группами лизоцима (ее pK_a близок к 6) и, как правило, в свободном ферменте она удерживает протон.

При сближении с гликозидной связью субстрата в фермент-субстратном комплексе эта группа выступает как донор протона, присоединяющегося к гликозидному атому кислорода с образованием неустойчивого положительно заряженного оксониевого иона:



Далее оксониевый ион стабилизируется за счет перемещения к атому кислорода электронной пары, обслуживавшей его связь с C-1-атомом звена D. Следует разрыв связи между этими атомами и вместе с тем между звеньями D и E, причем положительный заряд переносится на атом C-1 с образованием карбониевого иона. Дисахарид E-F или

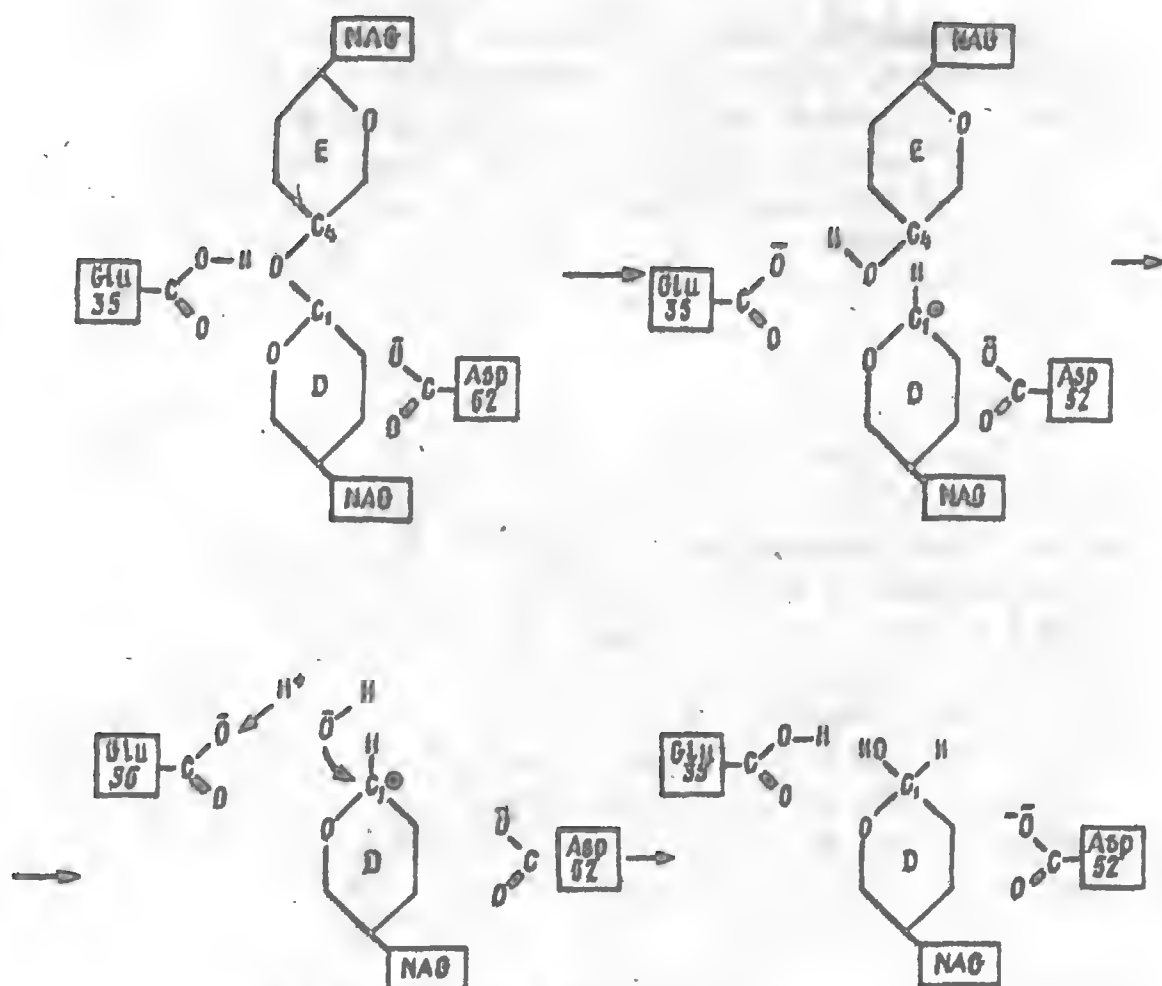


Рис. 10.9. Механизм действия лизоцима

Протон карбоксильной группы Glu-35 переносится на сближенный с ним кислород гликозидной связи, образуя оксониевый ион. Далее электронная пара, обслуживавшая связь атома C-1 NAG и этого атома кислорода, переносится на последний, что приводит к разрыву гликозидной связи. В результате атом C-1 оказывается заряженным положительно, т.е. приобретает свойства карбокатиона, имеющего плоскую структуру, чему благоприятствует конформация палукресла. Дополнительно заряд стабилизируется взаимодействием с отрицательно заряженной карбоксилатной группой остатка Asp-62. На завершающей фазе реакции молекула воды занимает место ушедшего кислорода гликозидной связи, поляризуется за счет взаимодействия с анионной формой Glu-35 и образовавшийся гидроксил-ион атакует несущий положительный заряд атом C-1 (остальные пояснения см. в тексте)

аналогичный фрагмент более длинного субстрата покидает после этого зону связывания субстрата, так как его соединяют с ней лишь немногие нековалентные взаимодействия, а связь с фрагментом A-B-C-D утрачена.

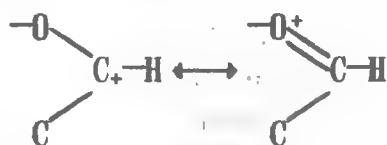
Остаток Glu-35 критически важен для каталитического механизма — его замена на глутамин, проведенная методом сайт-специфичного мутагенеза, лишает фермент активности.

Положительный заряд на C-1 стабилизируется двумя факторами:

1. Устанавливается электростатическое взаимодействие между ним и отрицательно заряженным карбоксилат-анионом Asp-52, весьма эффективное в отсутствие воды, которая вытесняется с поверхности фермента при связывании субстрата. Заслуживает внимания то, что кислотные свойства карбоксильной группы этого остатка в отличие от карбоксила Glu-35 усилены его гидрофильным окружением. Это объясняется тем, что анионная форма карбоксила Asp-52 стабилизируется путем включения в систему водородных связей с соседними остатками.

Следует обратить внимание на столь характерное для белков вообще изменение свойств функциональных групп за счет разницы в их микроокружении. Роль этой группы нельзя недооценить, но она, видимо, не абсолютно необходима — замена Asp-52 на аспарагин снижает удельную активность фермента примерно до 5% от исходной, но не приводит к полной его инактивации.

2. Положительный заряд на атоме C-1 частично компенсируется смещением электронной пары от соседнего с ним атома кислорода в цикле. При этом связь O — C⁺ приобретает характер частично двойной, что приводит к плоскостной конформации всего этого участка кольца D и переходу атома C-1 из обычной тетраэдрической в тригональную структуру:



Но как раз такая конформация, необходимая для стабилизации карбокатиона, соответствует структуре полукресла и реализуется в фермент-субстратном комплексе за счет отмеченного выше искажения стереохимии кольца D при связывании олигосахарида. По-видимому, необходимая для этого энергия "заимствуется" из энергии связывания протяженного субстрата.

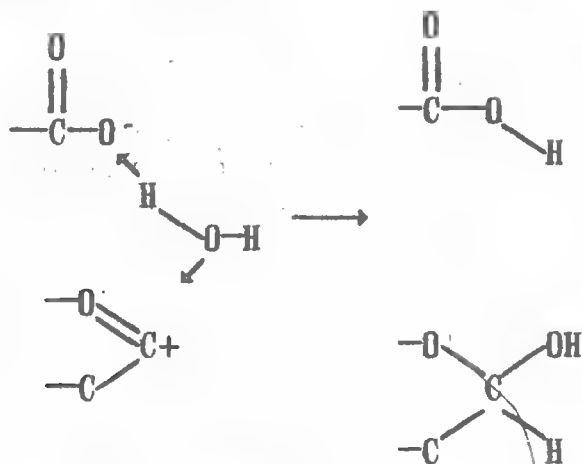
Таким образом, электростатические и стереохимические эффекты в каталитическом центре лизоцима действуют согласованно, стабилизируя структуру плоского карбокатиона, характерную для переходного состояния в фермент-субстратном комплексе.

Далее карбокатион подвергается атаке молекулой воды, которая связывается анионом остатка Glu-35, занимая примерно то же место, в котором находился кислород гликозидной связи перед ее расщеплением.

Анион Glu-35 поляризует молекулу воды, отрывая протон, что соответствует свойствам карбоксильной группы этого остатка как

слабой кислоты. Образующийся сильный нуклеофил — OH^- -ион — атакует положительно заряженный атом углерода C-1 с одновременной нейтрализацией зарядов. Поскольку молекула воды приближается к плоскому карбокатиону с той же стороны, где находился кислород гликозидной связи, стереохимия атома C-1 полностью восстанавливается и гидроксильная группа при этом атоме занимает, подобно кислороду гликозидной связи, β -положение:

Glu-35



Этим завершается цикл ферментативной реакции, в результате которого β -гликозидная связь в муреине оказывается гидролизованной, а лизоцим — готовым к последующим циклам каталитического механизма.

Характерно, что лизоцим фага T4 действует на полисахарид бактериальных стенок аналогично, также используя перевод моносахаридного звена при атакуемой связи в конформацию полукресла, однако в каталитическом механизме этого фермента принимают участие иные функциональные группы. *Искажение конформации субстрата как существенный элемент каталитического механизма* предполагают и для некоторых других ферментов, атакующих гликозидные связи, в частности для фосфорилазы.

В заключение отметим *главные черты механизма действия* лизоцима:

- организация системы нековалентных взаимодействий, фиксирующих протяженный субстрат;

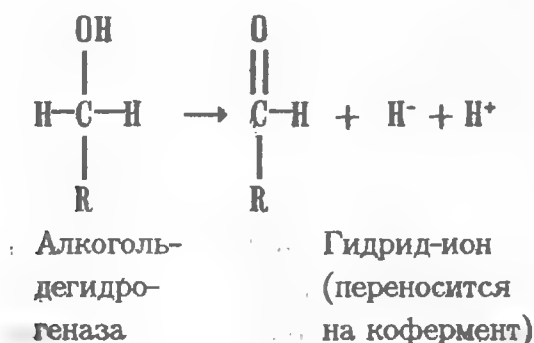
- стерические ограничения на связывание именно того звена в субстрате, гликозидная связь которого расщепляется, и, как следствие, перевод его в необычную конформацию, выгодную для стабилизации карбокатиона в переходном состоянии;

- согласованное действие двух карбоксильных групп, одна из которых выступает в качестве донора протона, а другая в анионной форме способствует стабилизации карбокатиона в переходном комплексе.

10.7. АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА

Как ни велики возможности ансамблей, образованных функциональными группами белка, в ряде случаев они недостаточны, например при катализе некоторых окислительно-восстановительных реакций. Такие затруднения, однако, могут быть преодолены путем вовлечения в механизм действия ферментов небелковых лигандов — ионов металлов или коферментов. Примером такого механизма является действие *алкогольдегидрогеназы* печени.

Этот фермент катализирует перенос гидрид-иона H^- от группы CH_2OH первичных спиртов различной структуры на никотинамидную часть кофермента — никотинамидадениндинуклеотид (NAD). Схематически эта реакция может быть представлена следующим образом:



Тот же фермент, как обычно, способен катализировать и обратную реакцию — восстановление альдегида до спирта:

Хорошо изученная алкогольдегидрогеназа печени лошади построена из двух одинаковых субъединиц, каждая из которых содержит в одной полипептидной цепи 374 аминокислотных остатка и образует два домена. *Каталитический домен*, в котором локализованы все компоненты активного центра фермента, в том числе и остатки, связывающие еще один небелковый лиганд — участвующий в катализе *ион цинка*, — объединяет N-концевой (остатки 1—175) и C-концевой (остатки 319—374) фрагменты полипептидной цепи.

Кофермент(нуклеотид)связывающий домен сформирован центральным фрагментом (остатки 176—318). По вторичной и третичной структуре он очень сходен с нуклеотидсвязывающими доменами других ферментов, хотя их первичные структуры не обнаруживают сколько-нибудь существенных соответствий.

Предполагают, что характерная пространственная структура нуклеотидсвязывающего домена возникла на весьма ранних этапах эволюции и многократно использовалась как готовый *функциональный* лиганд.

дуль, который мог объединяться с соответствующими каталитическими центрами, образуя различные ферменты, содержащие NAD в качестве кофермента. Понятно, что такой путь эволюции ферментов эффективнее создания всякий раз *de novo* функционально однотипной структуры.

Контакт между субъединицами определяется преимущественно взаимодействием нуклеотидсвязывающих доменов, которые образуют своего рода "ядро" димера. Как это нередко бывает при образовании четвертичной структуры, β -складчатый лист одной субъединицы "стыкуется" с такой же структурой другой субъединицы, образуя весьма протяженный β -складчатый слой. Это взаимодействие дополняется развитой сетью гидрофобных контактов, в которых участвует около 30 аминокислотных остатков, что делает диссоциацию димера весьма трудной даже в 8 М мочеvine.

Связывание кофермента. Аденозиндифосфатрибозный фрагмент NAD дает множество нековалентных контактов с ферментом. Аденин располагается в гидрофобном кармане, 2'-гидроксил рибозы аденозина образует водородную связь с карбоксилем Asp-223, пирофосфатная группировка — солевую связь с гуанидином Arg-47, принадлежащего каталитическому домену. "Концевой", т.е. ближайший к никотинамиду, остаток рибозы образует водородные связи с карбонильными группами Gly-293 и Ile-269. Множественность нековалентных связей обеспечивает точное размещение кофермента в активном центре алкогольдегидрогеназы.

Связывание субстрата. Зона связывания субстрата располагается в глубоком "кармане", канале между каталитическим и нуклеотидсвязывающим доменами одной из субъединиц, но в нее входят и отдельные аминокислотные остатки второй субъединицы. Этот канал как бы выстлан гидрофобными боковыми цепями, что позволяет установить гидрофобные контакты с радикалом R спирта. Интересно, что формирование этого канала завершается после связывания NAD и вызванного этим изменения конформации фермента. Алкогольдегидрогеназа печени может связывать весьма различные спирты — от этанола до производных бензилового спирта $C_6H_5CH_2OH$, ω -оксикислот и даже стероидных спиртов. Важно лишь, чтобы они содержали гидрофобный фрагмент в своей структуре. Среди остатков, участвующих в связывании бензилового спирта, Leu-116 и Leu-57, Val-294 и Phe-93. Сорбируясь, субстрат выталкивает из зоны связывания несколько молекул воды и в определенной мере стягивает прилегающую часть фермента в более компактную структуру. Не исключено, что это весьма небольшое изменение строения фермента, наведенное связавшимся субстратом, играет существенную роль в катализе.

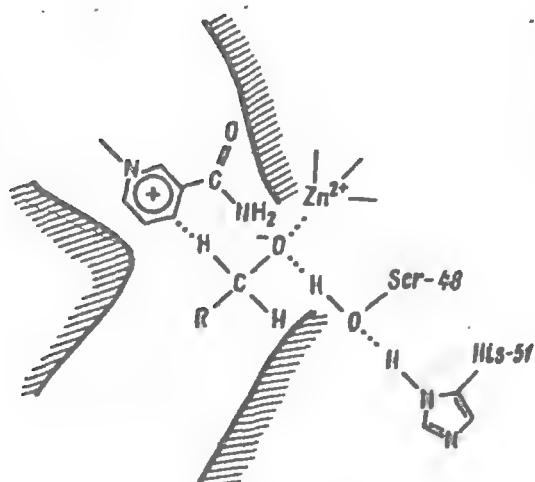
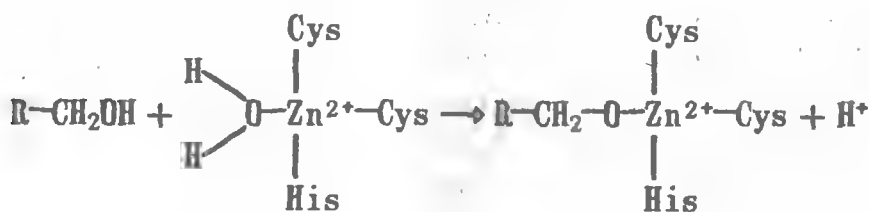


Рис. 10.10. Размещение субстрата в активном центре алкогольдегидрогеназы

При связывании субстрата (спирта) его гидроксильная группа сближается с ионом цинка и утрачивает протон, превращаясь в алкоголят. В отщеплении протона и стабилизации алкоголята участвует система водородных связей с Ser-48 и His-51

устанавливает непосредственную связь с ионом цинка, вытесняя из четвертого координационного положения находившуюся там молекулу воды (рис. 10.10). Это приводит к отщеплению протона гидроксильной группы, причем связь с ионом цинка образует алкоголят-анион спирта $R-CH_2O^-$:



Понятно, что существование такой структуры, чрезвычайно чувствительной к гидролизу, возможно только внутри каталитического центра, где реакция разыгрывается в отсутствие контактов с водой. В этом еще раз проявляется характерная особенность ферментативного катализа — перенос реакции в благоприятную среду.

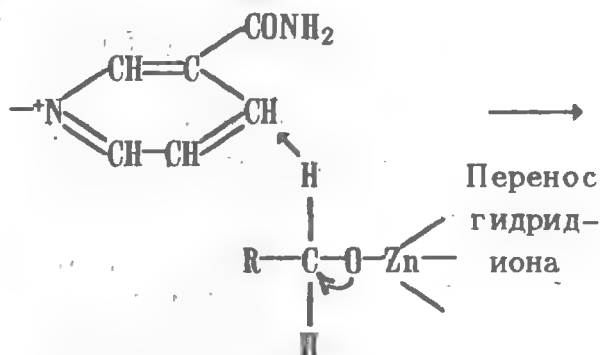
Алкоголят-анион далее стабилизируется путем смещения электронной плотности от атома кислорода алкоголята к связи $C-O$, которая в конечном счете превращается в двойную, а гидрид-ион от атома углерода переносится, видимо, по структурно детерминированному пути в

Компоненты каталитического центра. Каталитический центр алкогольдегидрогеназы содержит ион цинка, который окружен четырьмя лигандами, расположенными в вершинах неправильного тетраэдра. Три из них принадлежат белку — это тиоловые группы остатков Cys-46 и Cys-174 и имидазол His-67. Четвертое координационное место занимает кислород субстрата, а в его отсутствие — молекула воды. Гидроксильная группа остатка Ser-48 способна образовать водородную связь с кислородом лиганда — воды или спирта.

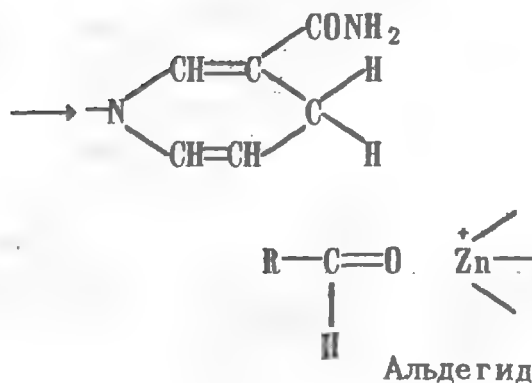
Вероятный механизм действия фермента. Предполагают, что спирт, гидрофобная цепь которого связана в гидрофобном канале фермента, ориентируется так, что его кислород

положение 4 никотинамидного ядра кофермента, причем NAD^+ превращается в восстановленную форму NADH :

Никотинамидный фрагмент
 NAD



Никотинамидный фрагмент
 NADH



При обратной реакции перенос гидрид-иона происходит от NADH к углероду альдегидной группы, двойная связь которой оказывается поляризованной за счет влияния связанного с ферментом иона цинка на атом кислорода. Такая поляризация усиливает частичный положительный заряд на атоме углерода карбонильной группы, что благоприятствует присоединению к этому атому гидрид-иона.

Рассмотренный пример показывает возможность обогащения функциональных свойств ферментов путем включения лигандов — иона металла и кофактора — в структуру активного центра.

10.8. ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА

Описанный механизм не является единственным для дегидрогеназ. Известны ферменты, которые способны катализировать сходную реакцию, не прибегая к использованию иона цинка или другого металла. Таковы, например, *лактат-* и *малатдегидрогеназы*. Каталитический

центр лактатдегидрогеназы описан достаточно хорошо, что подтверждается успехом направленного изменения субстратной специфичности лактатдегидрогеназы термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus*.

Связывание пирувата в активном центре лактатдегидрогеназы определяется в первую очередь электростатическим взаимодействием между карбоксилатной группой субстрата и гуанидогруппой остатка Arg-171 (рис. 10.11). Другие функциональные группы фермента, участвующие в связывании пирувата, одновременно выполняют и собственно каталитическую функцию — частый случай для небольших субстратов. Существенно, что образование ионной пары индуцирует характерное изменение конформации в активном центре — петля, включающая остатки 98—110, смещается, прикрывая каталитический центр и связанный в нем субстрат. Этим достигается перенос реакции из воды в благоприятную для процесса среду, приближение к центру реакции — карбонильной группе субстрата сразу нескольких функциональных групп фермента.

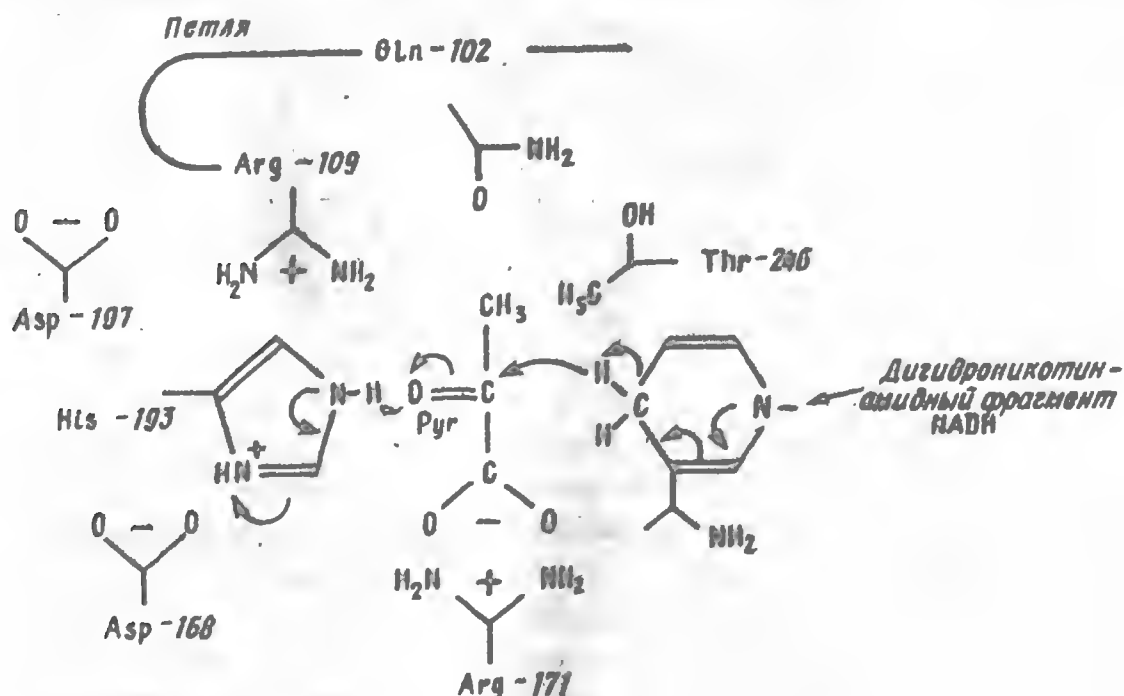


Рис. 10.11. Каталитический центр лактатдегидрогеназы

При связывании пирувата в активном центре образуется ионная пара между карбоксилат-анионом субстрата и гуанидиновой группой Arg-171. Взаимодействие протонированной имидазольной группы остатка His-193 с $C=O$ -группировкой субстрата усиливает поляризацию последней, а образующийся дефицит электронов у углерода кетогруппы компенсируется переносом гидрид-иона H^- от сближенного с субстратом никотинамидного кольца кофермента. Замена Gln-102 аргинином и введение мутаций, несколько увеличивающих впадину зоны связывания, дает ферменту возможность связать оксалоацетат, и он становится малатдегидрогеназой

Еще одним следствием такого переноса является значительное усиление взаимодействия между карбоксильной группой субстрата и гуанидином Arg-171, а также образование достаточно плотного окружения пирувата, что способствует повышению субстратной специфичности лактатдегидрогеназы. Этот фермент на три порядка активнее в отношении пирувата, чем оксалоацетата — субстрата малатдегидрогеназы, хотя оба фермента родственны, используют в качестве кофермента NAD, имеют сходную пространственную структуру и действуют по однотипному механизму.

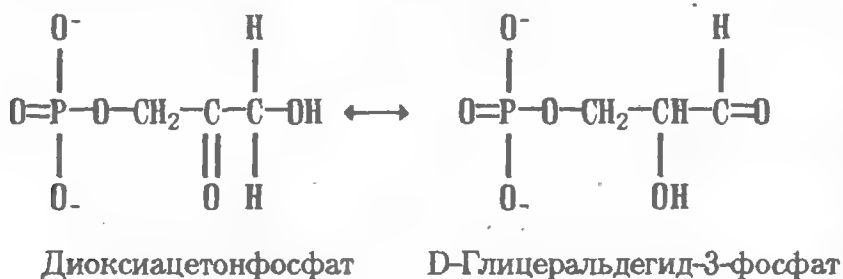
В связанном пирувате карбонильная группа поляризуется под влиянием катионной гуанидогруппы Arg-109, принадлежащей подвижной петле. Это приводит к возрастанию частичного отрицательного заряда на кислородном атоме и положительного — на атоме углерода группы $C=O$ субстрата. Последнее облегчает перенос гидрид-иона от дигидропиридиновой формы никотинамидного фрагмента NADH на углерод карбонильной группы, в то время как протон пространственно сближенного с субстратом имидазола His-193 переносится на отрицательно заряженный кислород, чем и завершается восстановление карбонильной группы и превращение пирувата в лактат.

Заметим, что роль имидазольного кольца His-193 как донора протона облегчается тем, что эта группа находится под влиянием карбоксила Asp-168, который отдает свой протон имидазолу, компенсируя переход протона от другого атома азота имидазола на карбонильный кислород субстрата. Таким образом, здесь реализуется нечто вроде "эстафеты заряда", впервые обнаруженной для ансамбля Asp-His в сериновых протеиназах.

Как уже отмечалось, фермент обладает весьма высокой субстратной специфичностью. Он на три порядка хуже катализирует близкую по характеру реакцию восстановления оксалоацетата. Видимо, связывание субстрата, отличающегося от пирувата присутствием еще одной карбоксильной группы, было бы сопряжено с переносом этого карбоксилат-аниона из воды в зону связывания субстрата, а энергетические затраты на его дегидратацию не были бы ничем скомпенсированы. Замена остатка Gln-102 в подвижной петле фермента на аргинин позволяет ввести в зону связывания субстрата модифицированного фермента катионную гуанидиновую группу, способную в отсутствие воды установить электростатическое взаимодействие со вторым карбоксилат-ионом оксалоацетата. Этого достаточно для превращения лактатдегидрогеназы в высокоэффективную малатдегидрогеназу: фермент катализирует реакцию с оксалоацетатом в 8400 раз эффективнее, чем с пируватом, и обнаруживает даже несколько лучшую активность, чем природная малатдегидрогеназа.

10.9. ТРИОЗОФОСФАТИЗОМЕРАЗА

Триозофосфатизомераза — фермент, относящийся к классу изомераз; катализирует взаимопревращения диоксиацетонфосфата и D-глицеральдегид-3-фосфата:



Фермент относится к числу наиболее эффективных: скорость превращения субстрата определяется скоростью его диффузии. Хорошо изучено строение триозофосфатизомеразы трипаносом, которой структурно близок фермент животных. Триозофосфатизомераза — димер, образованный идентичными субъединицами. Каждая из них представляет собой полипептидную цепь из 250 аминокислотных остатков, третичная структура которой относится к α/β -типу и содержит правильно чередующиеся восемь α -спиралей и восемь отрезков β -структуры.

β -Структурные участки образуют внутренний цилиндр, защищенный от воды α -спиралями (рис. 10.12). В формировании каждого из двух активных центров участвуют обе субъединицы, поэтому мономер не активен. В то же время между активными центрами нет кооперативности, иными словами, функционирование любого из них не зависит от того, действует ли другой центр, хотя присутствие второй субъединицы обязательно.

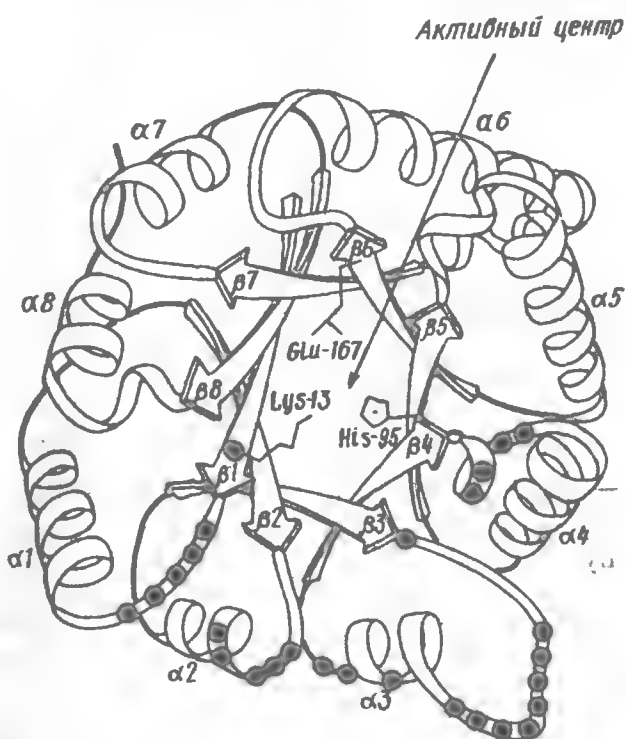
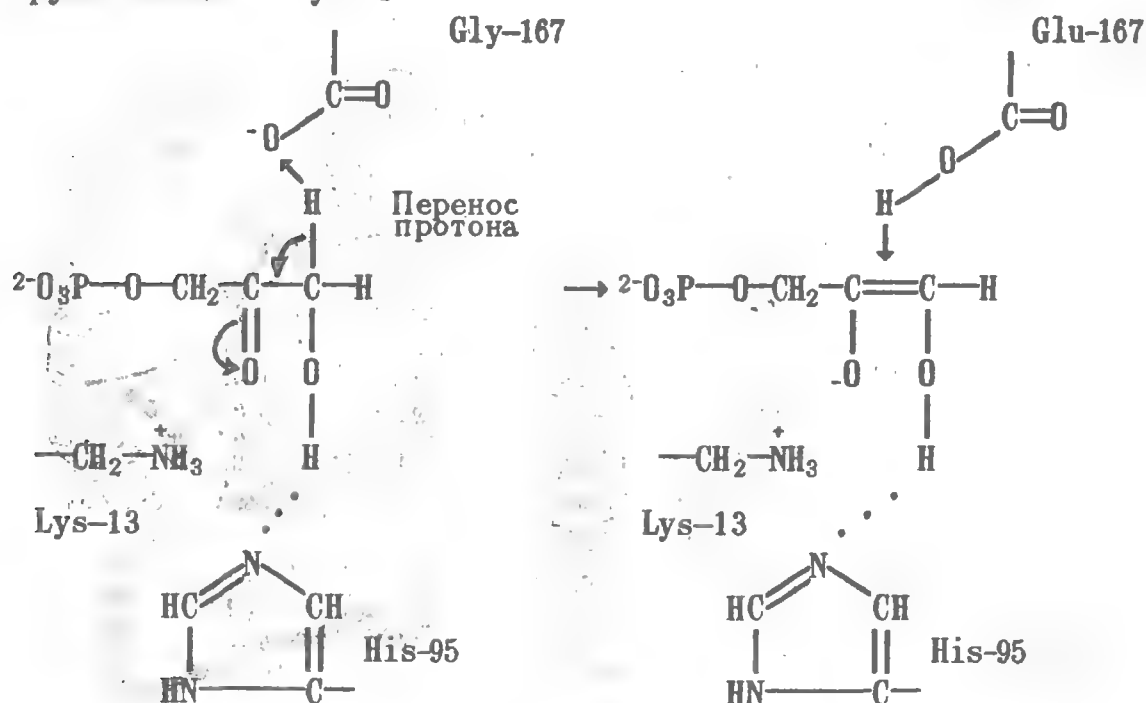


Рис. 10.12. Размещение каталитического центра в пространственной структуре триозофосфатизомеразы

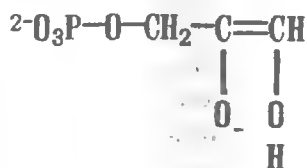
Функциональные группы каталитического центра размещены во впадине, которая закрывается при связывании субстрата за счет перемещения петли, расположенной между отрезком $\beta 3$ и спиралью $\alpha 3$

В связывании субстрата важнейшая роль принадлежит фосфатной группе, которая образует с ферментом семь водородных связей, дополняемых ионным взаимодействием с аммонийной группой Lys-13. Образование фермент-субстратного комплекса вызывает довольно значительное — на 3 — 5 Å — перемещение подвижной петли, содержащей остатки 167—178. Главным результатом этого изменения конформации фермента является *исключение воды из активного центра*, что благоприятствует протеканию изомеризации.

В связанном субстрате (в качестве которого далее рассматривается *диоксиацетонфосфат*) один из атомов водорода метиленовой группы оказывается в поле отрицательно заряженного карбоксилат-иона остатка Glu-167. Этот водород отщепляется от субстрата как протон и переходит к карбоксилу Glu-167. Освободившаяся электронная пара, которая обслуживала связь C-H, мигрирует к соседней связи C-C, делая ее двойной. Это влечет за собой поляризацию двойной связи C=O с появлением на ее атоме кислорода отрицательного заряда, стабилизируемого электростатическим взаимодействием с катионной аммонийной группой остатка Lys-13:

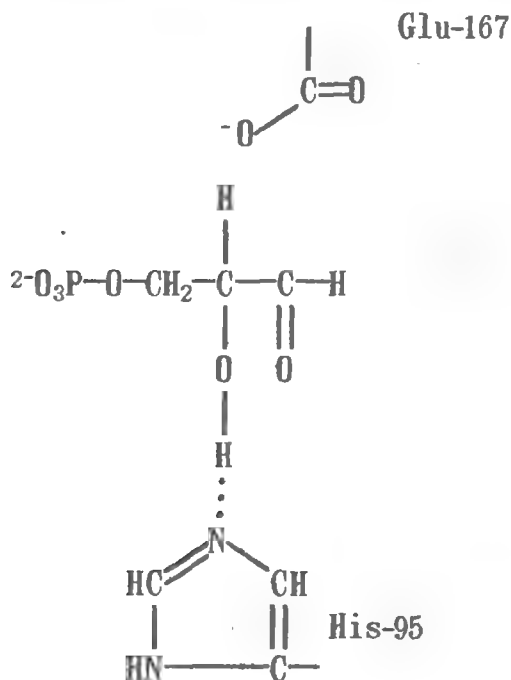


Вся эта цепь превращений переводит субстрат в анионную форму неустойчивого эндиола:



Далее протон переходит от карбоксильной группы Glu-167 ко второму углеродному атому субстрата, присоединяясь к двойной связи C=C.

Одновременно между C-1 и атомом кислорода устанавливается двойная связь за счет отщепления протона от гидроксильной группы при C-1 и его миграции сначала к азоту имидазольной группы His-95, а затем к отрицательно заряженному кислороду при C-2 субстрата. Путь этой миграции предопределен, как и в механизме действия сериновых протеиназ, присутствием в активном центре имидазольной группы гистидина:



Замена глутаминовой кислоты в положении 167 на аспарагиновую, проведенная методом белковой инженерии, отодвигает критически важную для катализа карбоксильную группу от субстрата примерно на 1 Å, в результате чего скорость реакции снижается почти в 10^3 раз. То, что модифицированный таким образом фермент все же сохраняет активность, можно объяснить колебаниями в структуре фермент-субстратного комплекса, которые могут, хотя и с малой вероятностью, сближать карбоксильную группу аспарагиновой кислоты с углеродными атомами субстрата.

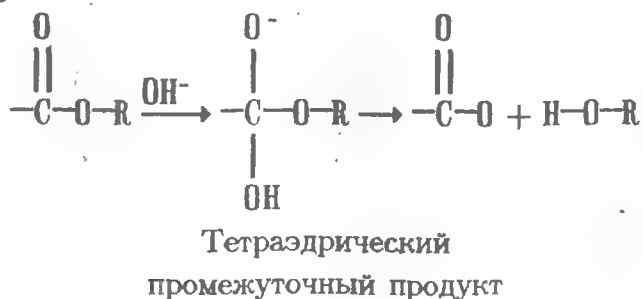
Таким образом, и в механизме действия триозофосфатизомеразы проявляются характерные черты ферментативного катализа — перенос реакции из водной фазы внутрь фермента, что обусловлено перемещением одного из участков структуры в ответ на связывание субстрата; координированное действие ансамбля функциональных групп, включенных вместе с прочно связанным субстратом в единую интегрированную систему.

10.10. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ("АБЗИМЫ")

Проверкой правильности понимания принципов ферментативного катализа, в особенности представлений о важнейшей роли, которая в этом процессе принадлежит стабилизации переходного комплекса путем его избирательного связывания в каталитическом центре, явилось создание искусственных ферментов, так называемых *абзимов*. Абзимы (от англ. AntiBody + enZYME) — представляют собой антитела, специфически связывающие структуры, которые химически близки переходному состоянию, образуемому в процессе катализа. Метод создания абзимов основан на том, что среди огромного множества возможных структур иммуноглобулинов (см. гл. 13) всегда могут быть найдены такие, которые содержат соответствующим образом ориентированные группы и способны избирательно связывать стабильные химические соединения, структурно близкие переходному состоянию той или иной реакции.

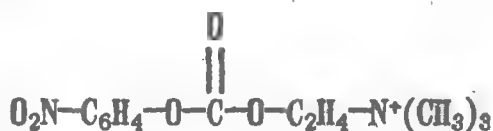
При образовании комплекса с таким иммуноглобулином возникнут благоприятные условия для того, чтобы строение субстрата приблизилось к структуре переходного состояния. Иными словами, будет понижена энергия активации субстрата, т.е. энергия, которую необходимо затратить на его перевод из основного состояния в переходное. Соответственно должны возрасти вероятность его превращения в продукт, а значит, и скорость реакции. Разумеется, пока речь идет не о создании катализаторов, эквивалентных по эффективности ферментам, а о получении их упрощенных моделей, хотя некоторые из них, возможно, и окажутся практически пригодными.

Первый подход к созданию абзимов состоял в получении *антител, специфически связывающих и стабилизирующих аналоги переходных состояний*, свойственных гидролитическим реакциям. Очевидно, что антитело к соединению (гаптену), напоминающему конфигурацию переходного состояния, будет стабилизировать эту структуру и тем самым понижать свободную энергию активации. Хорошо известно (см. разд. 10.5), что гидролиз амидов и сложных эфиров (например, щелочью) проходит через стадию образования тетраэдрического промежуточного продукта:

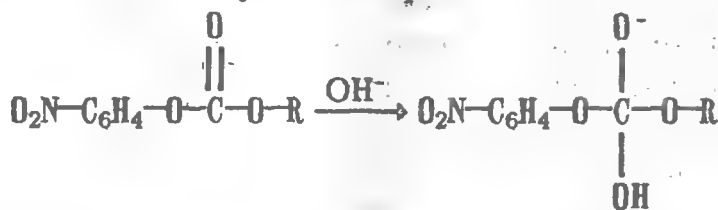


Анализ механизма действия гидролитических ферментов, в частности сериновых протеиназ (см. разд. 10.5), показывает, что его существенной чертой, действительно, является стабилизация переходного состояния, структурно близкого такому тетраэдрическому промежуточному продукту. Соответствующее соединение, которое имитировало бы такую структуру и содержало бы у одного углеродного атома три атома кислорода (или два атома кислорода и один азота при моделировании протеиназ), синтезировать не удается — оно слишком неустойчиво. Однако возможно получение достаточно стабильных тетраэдрических структур, стереохимически близких ему, в которых центральное положение вместо атома углерода занимает атом фосфора. Присоединение такого рода соединений к белку-носителю в качестве гаптенa и иммунизация этими производными животных позволяет получить антитела, специфически связывающие молекулы, близкие по структуре и конформации к переходному состоянию, через которое происходит гидролиз сложных эфиров или амидов карбоновых кислот.

Так, при создании абзимов, рассчитанных на ускорение гидролиза сложного эфира угольной кислоты — *p*-нитрофенил-*N,N,N*-триметиламмонийэтилкарбоната

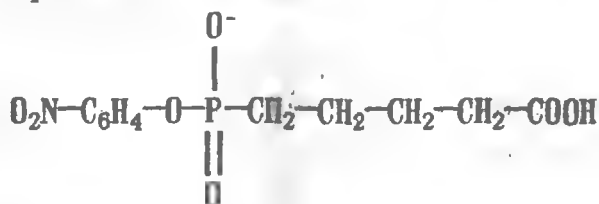


— были получены иммуноглобулины, специфически взаимодействующие с тетраэдрическими заряженными фосфонатными и фосфатными аналогами переходного состояния реакций гидролиза этого соединения, которое выглядит следующим образом:



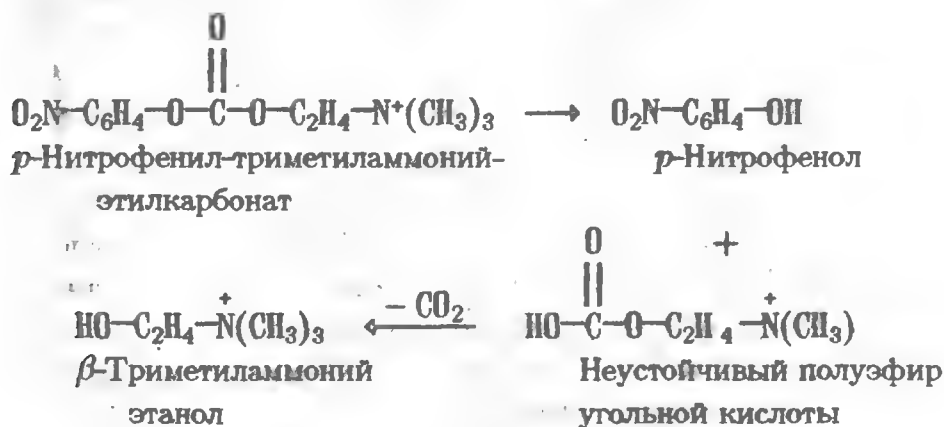
Здесь $\text{R}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$.

Его модель — фосфонатный аналог —



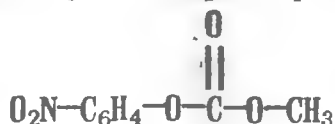
имеет структуру, стереохимически близкую, хотя и отличающуюся рядом деталей, в частности непосредственным присоединением углеро-

да боковой цепи к центральному атому фосфора, длиной этой цепи, плотностью отрицательных зарядов на атомах кислорода и т.п. Фосфонатный аналог был присоединен через карбоксильную группу к белку-носителю. К этой конструкции получены моноклональные антитела, которые, как оказалось, катализировали гидролиз субстрата — эфира угольной кислоты:



Кинетика этой, как и обычных ферментативных реакций, подчиняется уравнению Михаэлиса—Ментен. Гидролиз ингибируется соединениями — аналогами переходного состояния, причем K_i оказывались значительно ниже субстратной K_m . Следовательно, в соответствии с ожиданием антитело связывает аналог переходного состояния (это отражает K_i) прочнее, чем субстрат (что характеризует K_m). Это подтверждает важность стабилизации переходного состояния для катализа. Скорость реакции зависит от первой степени концентрации гидроксильного иона и превышает некаталитическую в 10^3 — 10^4 раз. Разумеется, ферментативная реакция дала бы на несколько порядков большее ускорение, однако необходимо учитывать, что при конструировании абзима моделировалась только одна, хотя и весьма важная, черта энзиматического катализа — стабилизация переходного состояния. К тому же, как указывалось, связывание фосфонатного аналога лишь приближенно, а не совершенно точно воспроизводит систему стабилизирующих взаимодействий. Существен принципиальный результат — создание фермента, пусть пока недостаточно эффективного, на основе имеющихся представлений об основных чертах каталитического процесса.

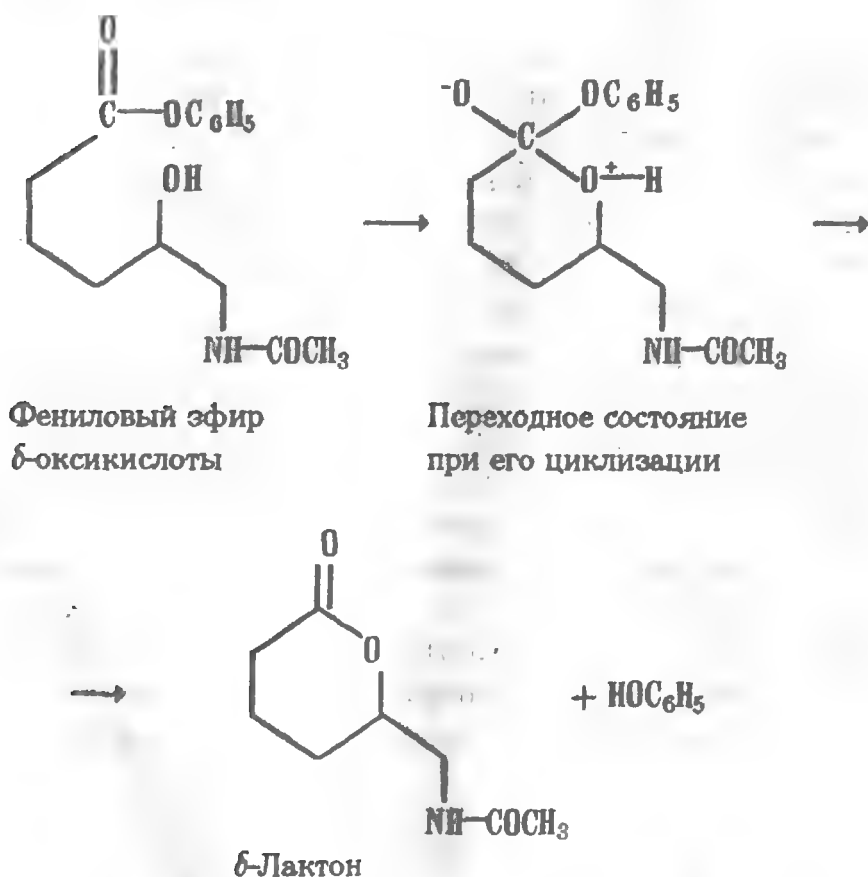
Для реакции характерна субстратная специфичность — антитело против аналога катализирует гидролиз только указанного выше соединения, но не родственного ему метил-*p*-нитрофенилкарбоната:



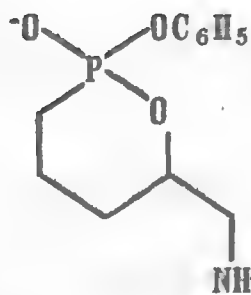
Рентгеноструктурный анализ антитела, связывающего фосфорилхолин и, вероятно, имеющего что-то общее с рассматриваемым каталитическим антителом, показывает, что гуанидогруппа остатка Arg-52 и гидроксил Tyr-33 тяжелой цепи могут взаимодействовать с кислородом фосфатной группы. По-видимому, и в каталитическом антителе аналогичным образом стабилизируется переходное состояние и эти же аминокислотные остатки связываются с атомами кислорода в его структуре. В то же время остаток Glu-35, также находящийся в тяжелой цепи, образует ионную связь с аммонийной группой субстрата, чем, в частности, обеспечивается специфичность абзима.

Иной путь моделирования принципов энзиматического катализа состоит в использовании антитела для надлежащего сближения реагирующих компонентов или участков претерпевающей превращение молекулы в активном центре. Так, антитело, специфически связывающее бициклический ингибитор хоризматуазы, избирательно ускоряет превращение хоризмовой кислоты в префеновую в 10^4 раз ($k_{\text{кат}} = 2,7 \text{ мин}^{-1}$, $K_m = 260 \text{ мкМ}$).

Антитело к фосфатному аналогу δ -лактона, формула которого приведена ниже, ускоряет в 167 раз циклизацию фенолового эфира соответствующей δ -оксикислоты в лактон:



Циклический фосфо-
нат, имитирующий
структуру переход-
ного состояния в
реакции циклизации
 δ -оксикислоты



Вставка, ис-
пользуемая
для присоеди-
нения лиганда
к белку-носи-
телю

Интересные возможности открывает и введение в каталитические антитела дополнительных функциональных групп. Таким образом, получение абзимов не только подтверждает правильность современных представлений о природе ферментативного катализа, но и открывает принципиальную возможность создания биологических катализаторов нового типа, в том числе и для реакций, не существующих в природе.

ГЛАВА 11

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКА

Полипептидная цепь — первичный продукт биосинтеза белка — часто подвергается химическим превращениям, изменяющим ее ковалентную структуру. Такие превращения могут происходить как в процессе трансляции (*котрансляционная модификация*), так и после ее окончания, нередко уже после формирования пространственной структуры белка. Многообразие этих реакций, завершающих созревание белка или видоизменяющих его функциональные свойства, очень велико — их число достигает 300—400. Иногда реакции посттрансляционной модификации называют *процессингом* (от англ. *processing* — обработка), подчеркивая этим, что они как бы завершают биосинтез белка. Этот термин не вполне точен, поскольку некоторые реакции, например фосфорилирование, могут происходить с одной и той же молекулой неоднократно, регулируя ее активность, другие, вероятно, служат сигналом к расщеплению белка.

Обычно реакции посттрансляционной модификации катализируются *специфическими ферментами*, хотя известны и внутримолекулярные превращения белков, происходящие без участия "внешних" ферментов. Реакции посттрансляционной модификации, как правило, имеющие функциональный смысл, направленность, принято отличать от более или менее случайных *повреждающих реакций*, также весьма многочисленных, которые происходят с белками *in vivo*, отражаясь на их структурной целостности и функциональных свойствах. К ним относят,

например, реакции окисления, случайный протеолиз и некаталитическое дезамидирование белка, присоединение глюкозы к аминок группам некоторых белков, в частности гемоглобина, при ее повышенном содержании в крови при диабете и т.п.

Реакции посттрансляционной модификации являются *нелатричными процессами*, они не кодируются непосредственно, поэтому нередко протекают неполно, что приводит к образованию *множественных форм* того или иного белка — продуктов частичного превращения.

Каков функциональный смысл реакций посттрансляционной модификации? На этот вопрос в обобщенной форме можно дать следующий ответ. *Во-первых*, несмотря на удивительное богатство структур, образуемых аминокислотными остатками и их ансамблями в пространственной структуре белка, это многообразие далеко не безгранично. Разумеется, образование комплексов с кофакторами (металлами, коферментами и т.п.) резко расширяет функциональные возможности белка. Однако и этот путь не всегда оказывается достаточным. В таких случаях структурная палитра белка может быть обогащена путем направленного преобразования боковых цепей тех или иных аминокислотных остатков, а иногда и молекулы в целом.

Во-вторых, что не менее важно, некоторые реакции посттрансляционной модификации, в особенности обратимые, позволяют управлять активностью белка или целых групп белков в ответ на изменяющиеся потребности клетки.

Заметим, что реакции посттрансляционной модификации в отличие от предшествующих им стадий трансляции очень индивидуальны, иногда свойственны только одному белку — к таким относятся, например, гидроксилирование остатков пролина в коллагене, иодирование тиреоглобулина и некоторые другие. Специфичность посттрансляционной модификации открывает перспективу избирательного воздействия на процессинг и, следовательно, функцию тех или иных белков.

Далее мы рассмотрим некоторые важнейшие реакции посттрансляционной модификации.

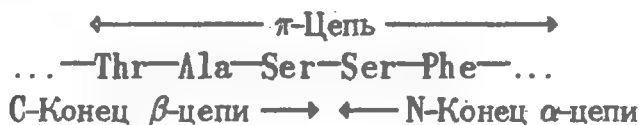
11.1. ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПЕРЕГРУППИРОВКИ В БЕЛКАХ

Эта группа превращений стоит особняком, поскольку они не катализируются каким-либо ферментом, а являются результатом внутримолекулярной реакции, направляемой, по-видимому, специфической пространственной структурой белка-предшественника. Последнее обстоятельство сближает такие реакции с каталитическими, поэтому иногда их описывают как автокаталитические процессы, хотя аналогия

не вполне справедлива, ибо в этом случае "активный центр" действует не многократно, как у ферментов, а только однажды.

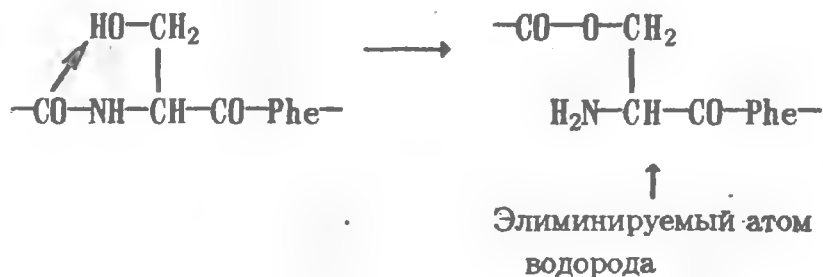
Профермент *гистидиндекарбоксилазы* молочнокислых бактерий *Lactobacillus*, а также *Clostridium perfringens* синтезируется в виде одной полипептидной π -цепи с молекулярной массой 34 кДа. При внутримолекулярной активации она превращается в цепи α и β с молекулярными массами соответственно 25 и 9 кДа. α -Цепь несет на аминном конце остаток *пирувинуградной кислоты*, который выполняет в активном центре фермента роль своеобразного кофактора и взаимодействует с аминогруппой гистидина, подвергающегося декарбоксилированию. Этот пирувоильный остаток функционально аналогичен пиридоксальфосфату — типичному кофактору ферментов аминокислотного обмена. Заметим, что π -цепь и продукт ее расщепления, построенный из α - и β -цепей, образуют гексамерную четвертичную структуру.

Особенно интересен путь расщепления π -цепи на α - и β -цепи, не являющийся гидролитическим. В последовательности аминокислот, которая соединяет будущие α - и β -цепь

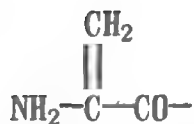


по-видимому, под влиянием пространственно сближенных функциональных групп прогистидиндекарбоксилазы происходит такая перегруппировка, в которой непосредственно участвуют соседствующие остатки серина. Сначала карбонильная группа предшествующего остатка серина переносится с аминной на гидроксильную группу следующего остатка:

N,O-Перенос
ацильной
группы

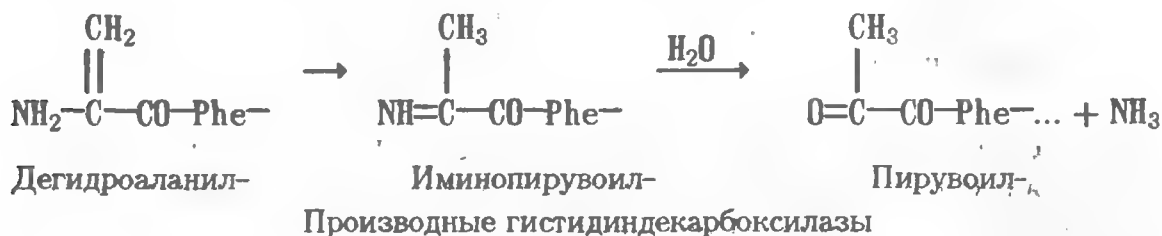


Это так называемая *N,O-ацильная миграция*. Затем ацильный компонент (β -цепь) *негидролитически* элиминируется за счет отщепления α -атома водорода остатка серина (β -элиминирование), оставляя на аминном конце уже образовавшейся α -цепи весьма неустойчивый остаток дегидроаланина:



Остаток дегидроаланина

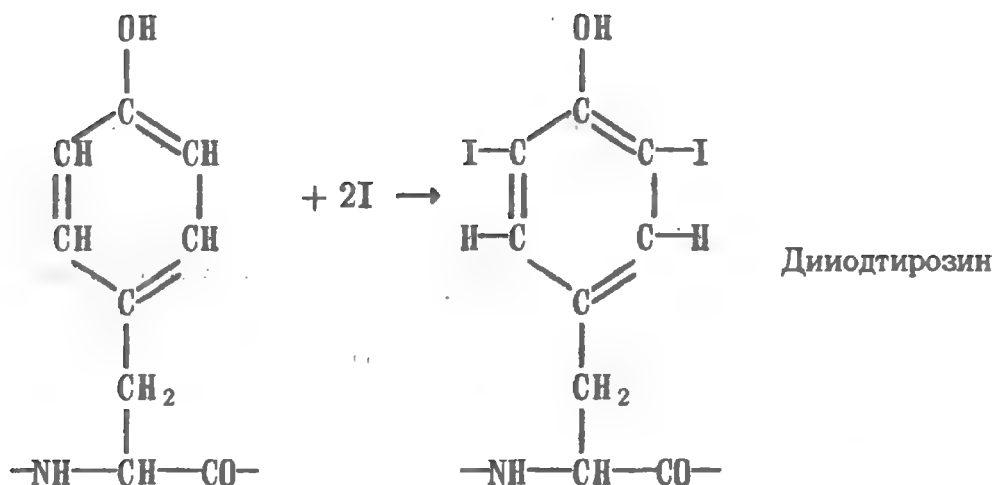
Дегидроаланин, по-видимому, изомеризуется в иминопроизводное пирувоильного остатка, которое затем реагирует с водой, отщепляя аммиак и превращаясь в пирувоильный остаток:



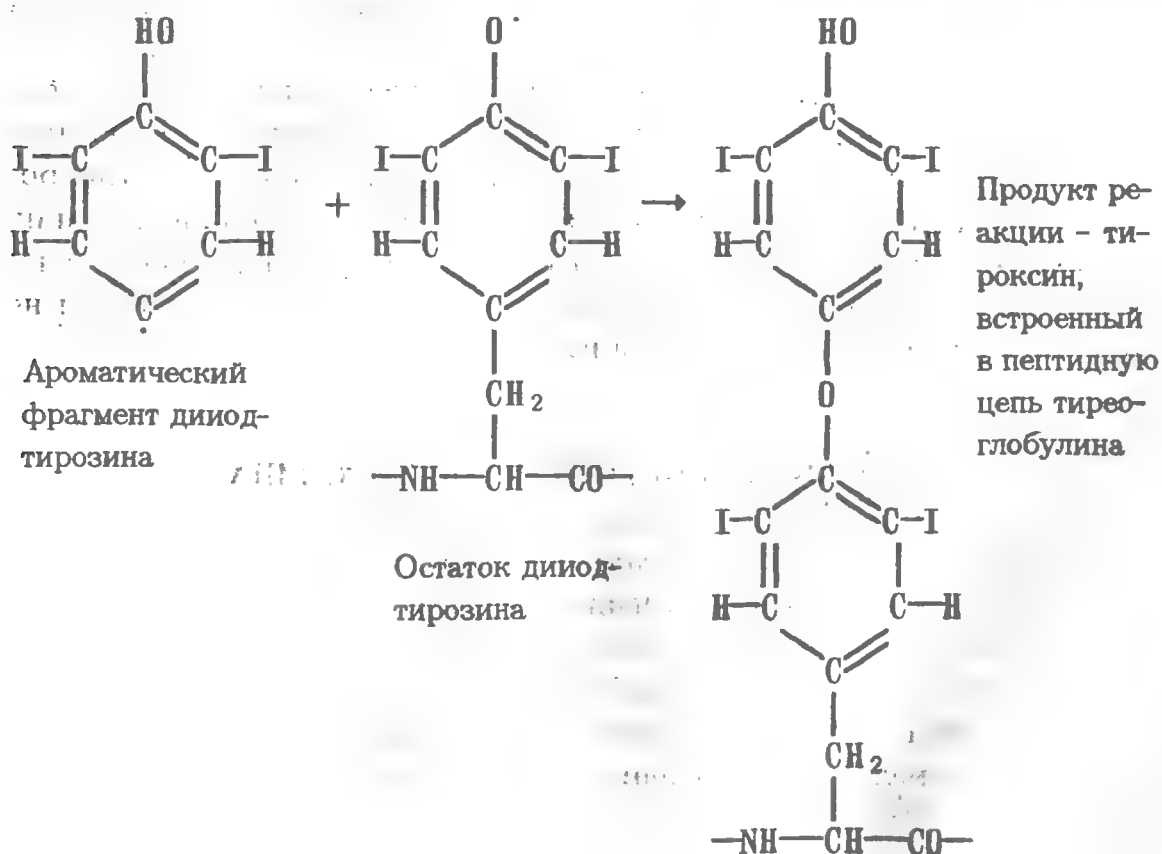
Следует подчеркнуть, что собственно расщепление полипептидной цепи происходит в этом случае без участия воды, негидролитическим путем. Интересно, что у других ферментов аминокислотного обмена — *лиаз*, отщепляющих аммиак от фенилаланина или гистидина с образованием соответствующих непредельных кислот (коричной в случае фенилаланина или урокаиновой в случае гистидина), наблюдается похожее превращение, которое приводит, однако, не к расщеплению пептидной цепи, а к образованию *дегидроаланина*, по-видимому, стабилизированного в пространственной структуре фермента. Вероятно, предшественником дегидроаланина в этих случаях является активированное производное серина или цистеина. Дегидроаланин в таких ферментах входит в состав *каталитического центра*, выступая в качестве электрофильной группы. Заметим, что электрофильные группы не свойственны традиционно построенным белкам.

11.2. ИОДИРОВАНИЕ ОСТАТКОВ ТИРОЗИНА

Эта реакция характерна для *тиреоглобулина* — высокомолекулярного белка, содержащегося в щитовидной железе и являющегося источником тироксина — гормона, влияющего на обменные процессы в тканях. Процесс начинается с избирательного иодирования немногих остатков тирозина в этом белке под действием иода, который образуется в свою очередь при окислении иодид-иона, катализируемом пероксидазой:



Иод далее атакует OH-группу тирозина по радикальному механизму и, отщепляя водород с образованием HI, оставляет неспаренный электрон на кислороде тирозина. Этот электрон способен перемещаться по ароматической системе сопряженных связей и может быть локализован в пара-положении, что приводит к разрыву связи $C^{\bullet}-CH_2$ по так называемому *гомолитическому* пути. Затем весь ароматический фрагмент, имеющий неспаренный электрон в пара-положении, внутримолекулярно переносится на кислород пространственно сближенного остатка диодтирозина:

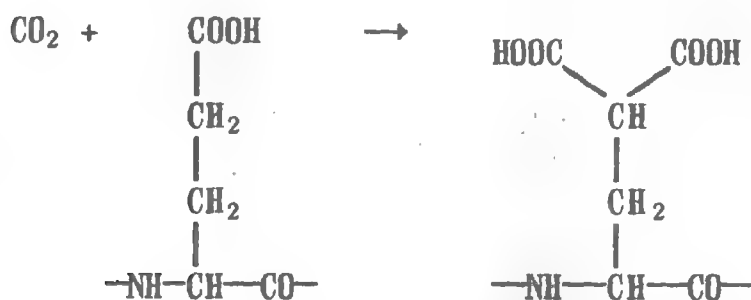


На модельных пептидах показано, что выход этой реакции, протекающей неферментативно, зависит от относительного расположения остатков тирозина, которое в тиреоглобулине, видимо, особенно благоприятствует процессу (для чего оба ароматических ядра должны быть копланарны). Иодированию и превращению в тироксин преимущественно подвергаются в этом белке остатки Tyr-5, 1291, 2555, 2748.

Высвобождение тироксина из тиреоглобулина происходит под действием специфической аспартильной протеиназы, содержащейся в щитовидной железе.

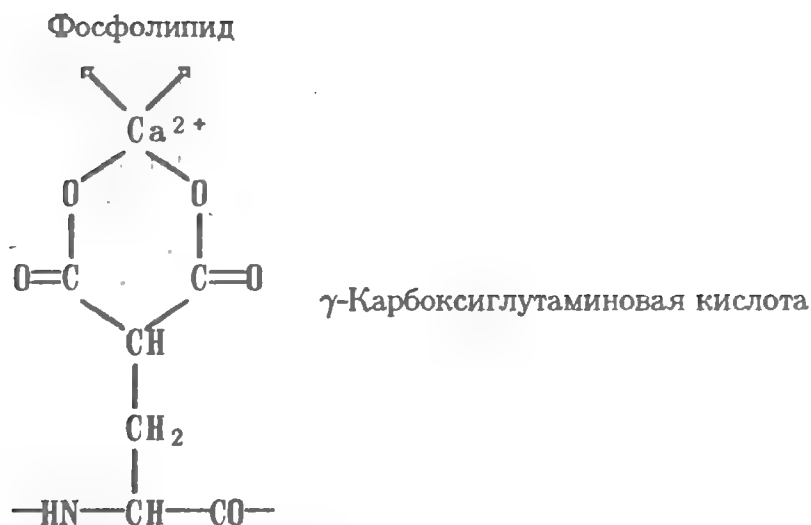
11.3. ОБРАЗОВАНИЕ ОСТАТКОВ γ -КАРБОКСИГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Такая реакция происходит в некоторых животных белках, функционирование которых требует образования комплекса с ионами кальция. Она состоит в прямом включении CO_2 в γ -метиленовую группу остатка глутаминовой кислоты:



Глутаминовая кислота γ -Карбоксиглутаминовая кислота

Эта реакция, протекающая только в присутствии витамина K, свойственна протромбину и многим другим белкам системы свертывания крови, в которых карбоксилированию подвергаются несколько (обычно около 10) остатков глутаминовой кислоты в аминоконцевом участке полипептидной цепи. Остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты за счет двух сближенных карбоксильных групп могут образовывать комплексы с ионами кальция, связанными в то же время с фосфолипидами клеточных мембран. Таким образом, ионы кальция выступают как своеобразные мостики, способствующие концентрированию белков системы свертывания крови на поверхности клеток, что облегчает их взаимодействие друг с другом:



Сходную роль играют остатки γ-карбоксиглутаминовой кислоты и в белке костной ткани - *остеокальцине*, который взаимодействует с ионами кальция на поверхности частиц гидроксилapatита - минерального компонента кости. Аналогично модифицированы остатки глутаминовой кислоты в *овокальцине* и *атерокальцине*, некоторых белках хрящей, почечных канальцев, а также в некоторых белках рибосом, которые содержат и β-карбоксиаспарагиновую кислоту.

Дефицит витамина К или присутствие его специфических ингибиторов, например дикумарина, блокирует γ-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты и приводит к глубоким нарушениям функции соответствующих белков, в частности к торможению свертывания крови.

11.4. ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ.

ГЛИКОПРОТЕИНЫ

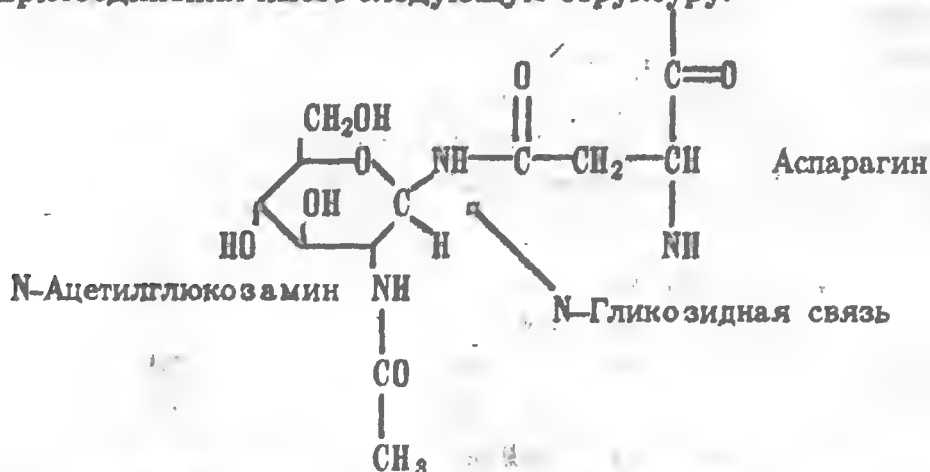
Гликопротеинами называют белки, содержащие ковалентно связанный углеводный компонент. Основываясь на структурной роли углеводного компонента, гликопротеины можно разделить на два класса. К одному из них принадлежат так называемые *протеоглики*, их пептидная цепь настолько плотно унизана олигосахаридными цепочками, что молекула в целом выступает подобно разветвленному полисахариду, ее полипептидный скелет постоянно скрыт. Протеоглики играют немалую роль в формировании межклеточного матрикса в тканях животных. Ко второму классу относятся такие *гликопротеины*, в которых полипептидная цепь формирует пространственную структуру по обычным правилам, свойственным белкам, а углеводные компоненты

присоединены к белковой глобуле. Далее речь будет идти именно о таких гликопротеинах.

Известны два основных способа ковалентного присоединения олигосахаридных цепочек к белкам.

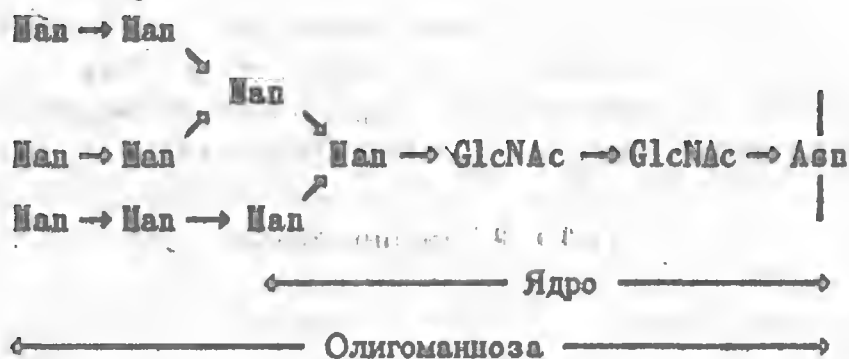
11.4.1. N-Гликопротеины

В этих гликопротеинах углеводный компонент присоединяется *N*-гликозидной связью (отсюда и название) к амидному азоту остатка аспарагина, включенного в пептидную цепь. Первым моносахаридным звеном, образующим *N*-гликозидную связь с аспарагином в гликопротеинах этой группы, всегда оказывается *N*-ацетилглюкозамин, так что "узел" присоединения имеет следующую структуру:

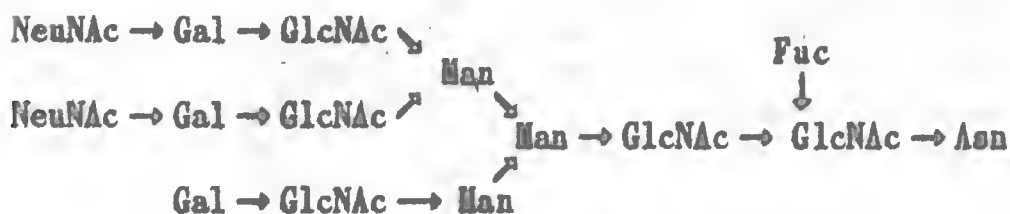


N-Гликозидная связь легко расщепляется в кислой среде, поэтому *N*-гликопротеины *кислотолабильны*. В гликопротеинах этого типа к остатку аспарагина присоединен олигосахарид, в котором к "узловому" остатку *N*-ацетилглюкозамина присоединен 1-4-связью еще один остаток *N*-ацетилглюкозамина, далее следуют несколько остатков маннозы, могут встречаться остатки *N*-ацетилглюкозамина, галактозы, нейраминовой кислоты, фукозы и некоторые другие моносахаридные звенья.

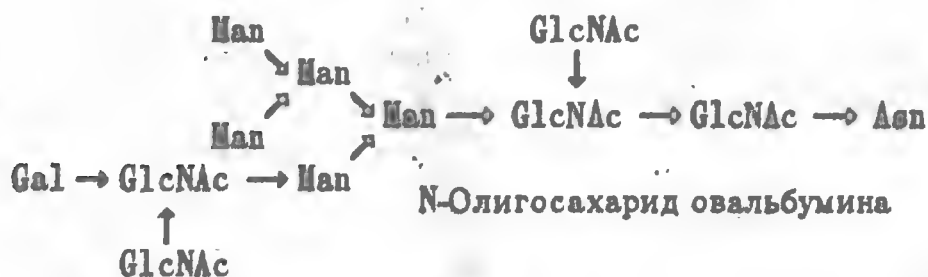
Биосинтез *N*-гликопротеинов происходит в шероховатом ретикулуме, причем на амидную группу аспарагина переносится под действием специализированного фермента за один шаг олигосахарид весьма сложной структуры $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, где Glc - остаток глюкозы, Man - маннозы, GlcNAc - *N*-ацетилглюкозамина. Далее он подвергается более или менее сложному процессу - отщеплению концевых моносахаридных звеньев, в частности полному отщеплению остатков глюкозы при помощи специфических глюкозидаз, частичному - маннозы маннозидазами. В результате этого остается так называемое "ядро", к которому присоединяются другие моносахариды:



За этим следует последовательное включение отдельных моносакхаридных звеньев, в результате чего к "маннозному ядру" присоединяются трисахаридные структуры NeuNAc → Gal → GlcNAc →, где NeuNAc - ацетилнейраминовая кислота, Gal - галактоза, иногда и другие моносакхариды, например фукоза - Fuc. Эти реакции специфичны, поэтому образующаяся в результате завершенная структура олигосахарида различна у разных белков. Ниже показана типичная разветвленная структура углеводных компонентов некоторых N-гликопротеинов:



Структура, типичная для белков сыворотки крови



N-Гликозилирование подвергаются лишь немногие из остатков аспарагина, имеющих в белках. Например, в панкреатической рибонуклеазе из 34 остатков аспарагина гликозилируется только один, находящийся в последовательности Asp-Leu-Thr, что приводит к образованию так называемой рибонуклеазы В. Реакция протекает, как это нередко случается при посттрансляционной модификации, неполно, и значительная часть молекул фермента остается негликозилированной (рибонуклеаза А).

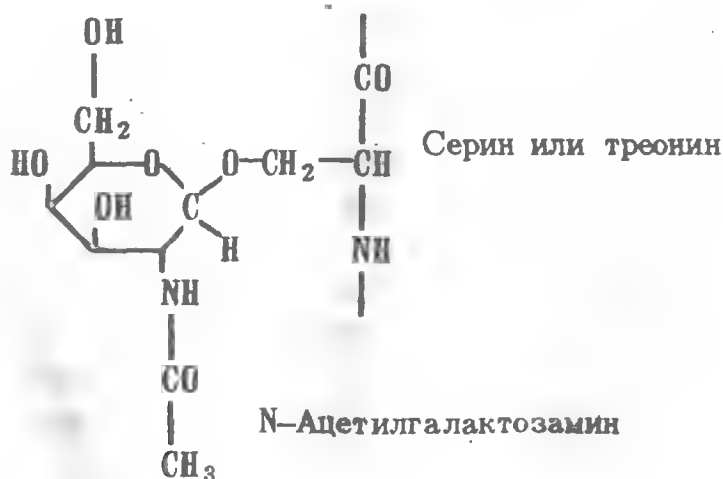
Исследование множества N-гликопротеинов показало, что присутствие оксиаминокислоты - треонина или серина через один остаток от аспарагина - служит сигналом для специфического фермента - олигосахаридтрансферазы, гликозилирующей аспарагин в последовательности Asn-Xaa-Ser(Thr), где Xaa - любая аминокислота. Это позволяет предсказать возможные точки N-гликозилирования по первичной структуре белка. Фермент, катализирующий N-гликозилирование, - олигосахаридтрансфераза - "узнает" амидную группу аспарагина, отделенного одним аминокислотным остатком от серина или треонина, если полипептидная цепь развернута. По-видимому, свертывание соответствующего участка в пространственную структуру препятствует гликозилированию. Этим объясняется отсутствие гликозилирования одного из двух остатков аспарагина в овальбумине *in vivo*, хотя *in vitro* удастся присоединить олигосахариды к обоим остаткам, входящим в указанную выше характерную для N-гликозилирования последовательность.

Антибиотик туникамидин блокирует N-гликозилирование белков. Фермент - гликопептидаза F - избирательно отщепляет олигосахариды от N-гликопротеинов.

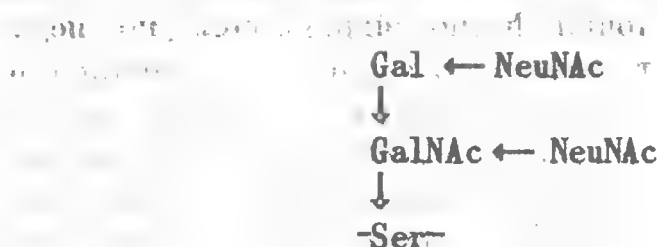
N-Гликозилирование характерно для секреторных белков, попадающих в эндоплазматический ретикулум, хотя оно не является непременной предпосылкой секреции.

11.4.2. O-Гликопротеины

В гликопротеинах этого типа углеводный компонент присоединяется O-гликозидной связью к оксигруппе остатка серина или треонина, причем "узловое" положение всегда занимает остаток N-ацетилгалактозамина:

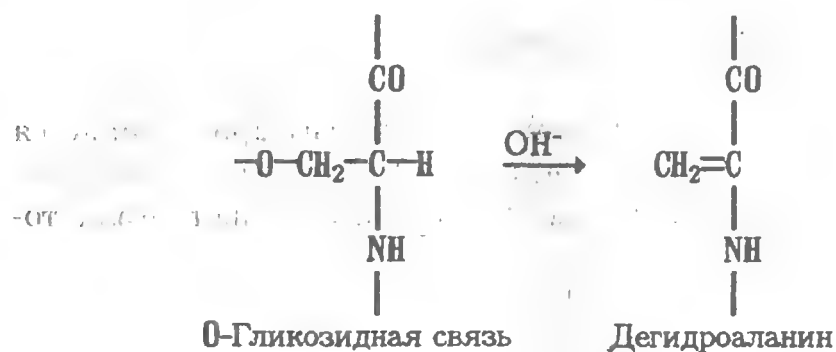


В отличие от N-гликозилирования биосинтез O-гликопротеинов происходит *ступенчато*. Вслед за присоединением "узлового" N-ацетилгалактозамина последовательно действующие гликозилтрансферазы присоединяют другие моносахаридные звенья, образуя, например, следующую структуру:



Однозначного "сигнала" в первичной структуре O-гликопротеинов, который определял бы подлежащий модификации остаток серина или треонина, не обнаружено. Имеются, однако, указания на то, что гликозилируется гидроксильная группа остатка серина или треонина, который следует за остатком пролина и входит в β -изгиб. Это указывает на то, что гликозилирование происходит уже после формирования пространственной структуры белка.

O-гликозидная связь расщепляется в щелочной среде, причем углеводный компонент отделяется от белкового вместе с водородом, принадлежащим α -углеродному атому серина, оставляя в полипептидной цепи дегидроаланин:



O-Гликозилирование встречается не столь часто в глобулярных белках, оно более свойственно муцинам (веществам, определяющим группу крови) — гликопротеинам, относящимся к классу протеогликанов. Однако в иммуноглобулинах, например, одновременно встречаются оба типа гликозилирования.

Весьма сложен вопрос о функциональной роли углеводных компонентов в гликопротеинах. В некоторых, правда немногих, случаях удалось определить пространственную структуру гликопротеинов. Оказалось, что олигосахаридные цепочки не образуют сколько-

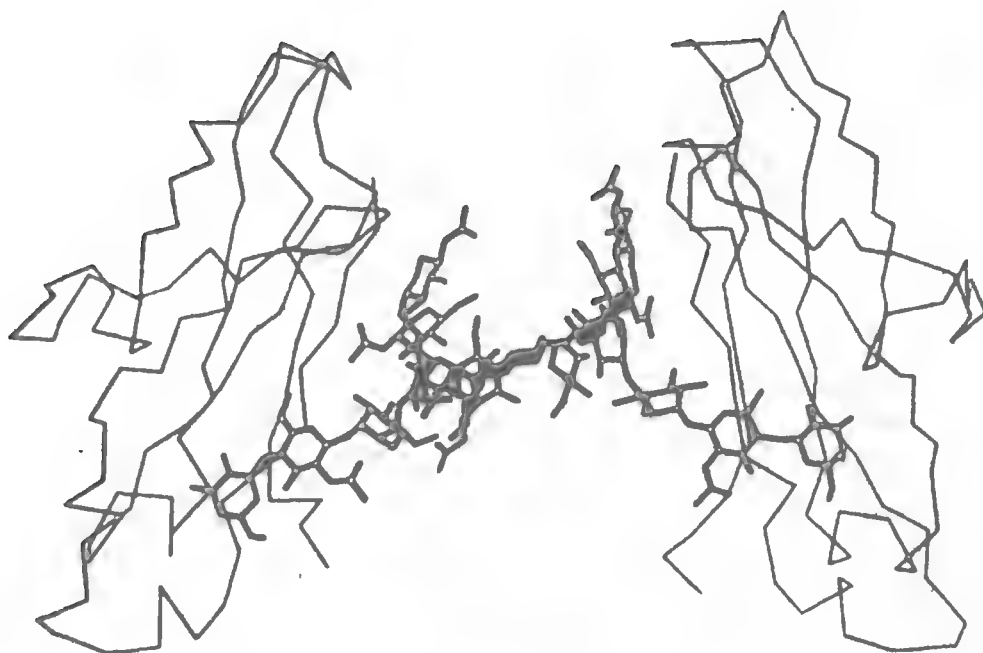


Рис. 11.1. Размещение углеводных цепей, присоединенных к остаткам аспарагина Asn-297 (выделены жирными линиями) между доменами C_H2 иммуноглобулина G кролика

Углеводные структуры образуют гидрофильную прокладку между поверхностями доменов

нибудь протяженных контактов с белковой глобулой, за исключением немногих водородных связей вблизи точки присоединения к белку, а направлены в сторону от глобулы и погружены в окружающую гликопротеин воду. Лишь для одного из иммуноглобулинов G оказалось, что углеводный компонент, содержащий шесть моносахаридных звеньев, как бы лежит на поверхности раздела двух доменов C_H2 и играет, по-видимому, роль своеобразной гидрофильной прокладки площадью около $500 \text{ \AA}^2$, не позволяя слипнуться гидрофобным поверхностям этих доменов (рис. 11.1). В других изученных случаях трудно говорить о структурообразующей роли углеводных компонентов.

Углеводный компонент практически никогда не участвует в *главной функции белка*, т.е. не входит в состав каталитического центра или зоны связывания ферментов, активные участки регуляторных белков и т.п. Активность, измеренная для пар гликозилированных и негликозилированных ферментов, неизменно оказывается одинаковой. Сказанное не относится, впрочем, к случаям, когда функция белка состоит в передаче сигнала — в таких белках, на-

пример в некоторых гормонах, углеводный компонент нередко критически важен для активности.

Как уже говорилось, гликозилирование сопровождается секрецией белков у животных, однако секреция может происходить и без гликозилирования; следовательно, включение углеводных компонентов есть результат, а не предпосылка секреции. Это хорошо иллюстрируют данные о доле гликопротеинов среди белков, содержащихся в секрете поджелудочной железы — 4,7%, коровьем молоке — 58%, синтезируемых в печени белках сыворотки крови — 59,7%. Однако в курином яйце гликозилировано около 97% суммы белков.

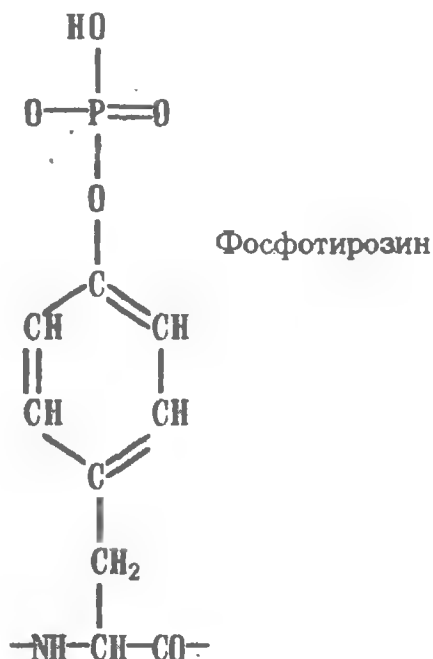
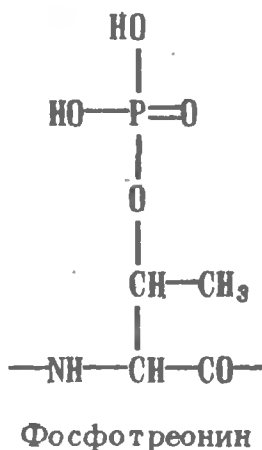
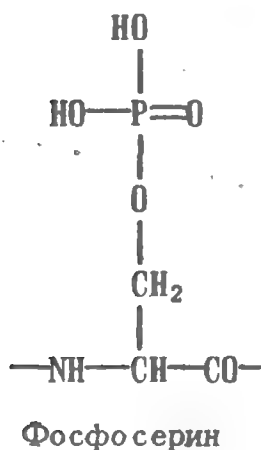
По-видимому, гликозилирование важно не для структуры или функции белка как такового, а для его взаимоотношений с другими компонентами клетки или организма, для его "поведения" в этих чрезвычайно сложных системах. Действительно, известно, что фосфорилирование одного из остатков маннозы в олигосахаридных структурах цитоплазматических ферментов, например внутриклеточной аспартильной протеиназы — катепсина D, "адресует" их в лизосомы. Присутствие другого моносахарида — сиаловой кислоты в гликопротеинах крови — способствует их удержанию в кровотоке; белки, подвергшиеся отщеплению концевых остатков сиаловой кислоты, быстро удаляются печенью. Например, церулоплазмин, циркулирующий в крови в среднем около 50 ч, после отщепления концевой сиаловой кислоты удаляется за несколько минут.

Несомненна физиологическая роль углеводных компонентов в гликопротеинах мембран — они неизменно располагаются в той части молекулы, которая направлена в окружающую среду, но почти всегда отсутствуют в цитоплазматических доменах этих белков. Углеводные компоненты участвуют в процессах межклеточного "узнавания", дифференциации, трансформации клеток, фагоцитозе, процессах оплодотворения, во взаимодействии клеток с вирусами, связывании гормонов с рецепторными белками.

Интересны гликопротеины антарктических рыб, понижающие точку замерзания жидкостей, — их функциональная роль вполне очевидна. В полипептидной цепи одного из них содержатся многочисленные повторы Ala-Ala-Thr, причем к гидроксильным группам треонина присоединены дисахаридные звенья галактозил-N-ацетилгалактозамина.

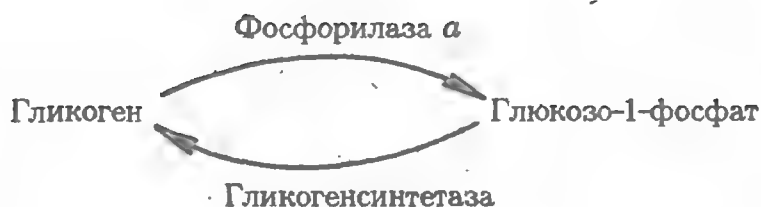
11.5. ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ. ФОСФОПРОТЕИНЫ

Белки фосфорилируют специфические ферменты — *протеинкиназы*, которые катализируют перенос концевго фосфата АТФ на гидроксильные группы остатков серина или треонина. Значительно реже наблюдается фосфорилирование гидроксила тирозина, так что содержание фосфотирозина составляет около 0,1% суммы фосфосерина и фосфотреонина; однако физиологическая роль этой модификации весьма велика.



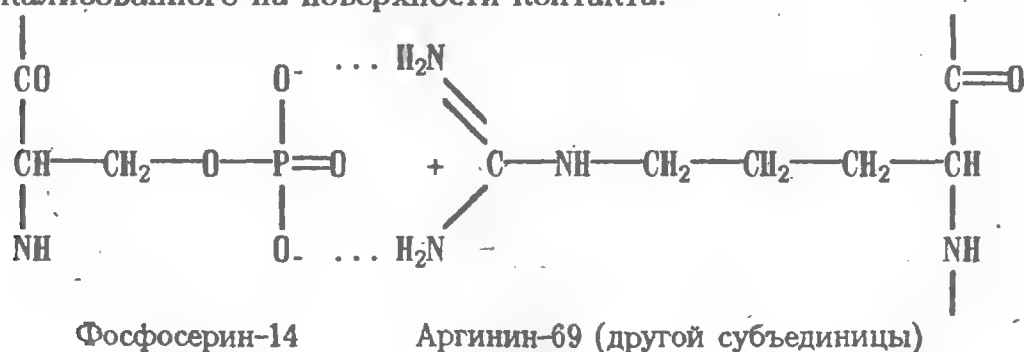
Фосфозфирные связи фосфопротеинов могут гидролизироваться специализированными ферментами — *фосфопротеинфосфатазами*. Таким образом, фосфорилирование — обратимый процесс. Белок за время своего существования может многократно переходить то в фосфорилированную, то в дефосфорилированную форму. Эта чрезвычайно важная особенность фосфорилирования — возможность обращения модификации — обусловила роль этой реакции как механизма, позволяющего *регулировать активность белка* и даже целых групп белков в ответ на изменяющиеся внутри- и внеклеточные стимулы.

Хорошо изучена роль фосфорилирования в регуляции *фосфорилазы* — фермента, катализирующего фосфоролиз запасного полисахарида — гликогена — с образованием глюкозо-1-фосфата, далее используемого в энергетическом обмене. Противоположную реакцию — включение остатка глюкозы из глюкозо-1-фосфата в гликоген — катализирует *гликогенсинтетаза*. Совместное действие этих двух ферментов позволяет проводить цикл превращений, показанный ниже:



Такой цикл требует *управления*, попеременного включения фосфорилазной или синтетазной активности с выключением противоположно направленной. Если бы такого управления не было, цикл превратился бы в бессмысленный. И действительно, активность гликогенфосфорилазы контролируется целым рядом факторов, один из которых — фосфорилирование и дефосфорилирование этого фермента. Нефосфорилированная *фосфорилаза b* практически неактивна, но превращается в активную форму — *фосфорилазу a* — при фосфорилировании соответствующей протеинкиназой только одного остатка серина — Ser-14. Чем может быть объяснена активация фермента, субъединица которого состоит примерно из 400 аминокислотных остатков, в результате, казалось бы, небольшого изменения ковалентной структуры?

Подвергающийся фосфорилированию остаток серина расположен на границе контакта двух субъединиц фосфорилазы, т.е. в районе относительно слабых взаимодействий, который особенно легко поддается перестройке уже при малых изменениях ковалентной структуры. Присоединение фосфата к Ser-14 влечет за собой установление электростатического взаимодействия и появление сразу двух водородных связей между фосфорной группой фосфосерина и гуанидогруппой остатка Arg-69, принадлежащего другой субъединице фермента и также локализованного на поверхности контакта:



Это изменяет систему нековалентных связей на поверхности контакта двух субъединиц, эффект передается в активный центр фермента. В результате пептидная петля, экранирующая активный центр в фосфорилазе *b*, отгибается и освобождает доступ субстрата к нему, активируя тем самым фермент.

Отщепление фосфата *фосфопротеинфосфатазой* вновь переводит

фосфосерин-14 в серин и восстанавливает свойственную неактивной фосфорилазе *b* систему нековалентных связей на границе между субъединицами, пептидная петля возвращается на прежнее место, блокируя каталитический центр.

Таким образом, столь значительные функциональные последствия фосфорилирования (и дефосфорилирования) обусловлены тем, что эти реакции происходят в относительно лабильной зоне белковой структуры — в области контакта субъединиц (как в рассмотренном случае) или доменов. Интересно, что регуляторное действие АМР на фосфорилазу основано на похожем принципе — аденозинмонофосфат образует прочный нековалентный комплекс с фосфорилазой *b*, связываясь на поверхности контакта субъединиц. Его фосфатная группа взаимодействует с двумя гуанидогруппами остатков аргинина и вызывает, как и в случае фосфорилирования Ser-14, цепь перестроек в структурно лабильной зоне фермента, опять-таки открывая каталитический центр. Результатом является активация фосфорилазы *b* — фермента, практически не активного в отсутствие АМР. Разница в том, что фосфорилирование активирует фермент, переводя его в фосфорилазу *a*, не зависимо от концентрации эффектора (в данном случае АМР) внутри клетки и, следовательно, в определенной мере не зависимо от биохимического статуса клетки.

Как уже отмечалось, перенос фосфата АТР на фермент катализируется протеинкиназой. Активность этого фермента, в свою очередь, контролируется и зависит от содержания в клетке так называемого "вторичного мессенджера" — сАМР. сАМР-зависимая протеинкиназа состоит из неодинаковых субъединиц: регуляторной *R*-субъединицы, способной связывать эффектор, т.е. сАМР, и каталитической *C*-субъединицы. Регуляторная субъединица выступает как ингибитор протеинкиназы, в комплексе с ней каталитическая субъединица лишена активности. При связывании регуляторной субъединицей сАМР, которое происходит за счет нековалентных взаимодействий, она утрачивает способность образовывать четвертичную структуру. В результате каталитическая субъединица высвобождается и оказывается способной фосфорилировать белки.

Снижение концентрации свободного сАМР в клетке приводит к тому, что синтезируемая в избытке регуляторная субъединица вновь связывается с каталитической субъединицей, вызывая ингибирование фермента. Так реализуется динамическое равновесие:

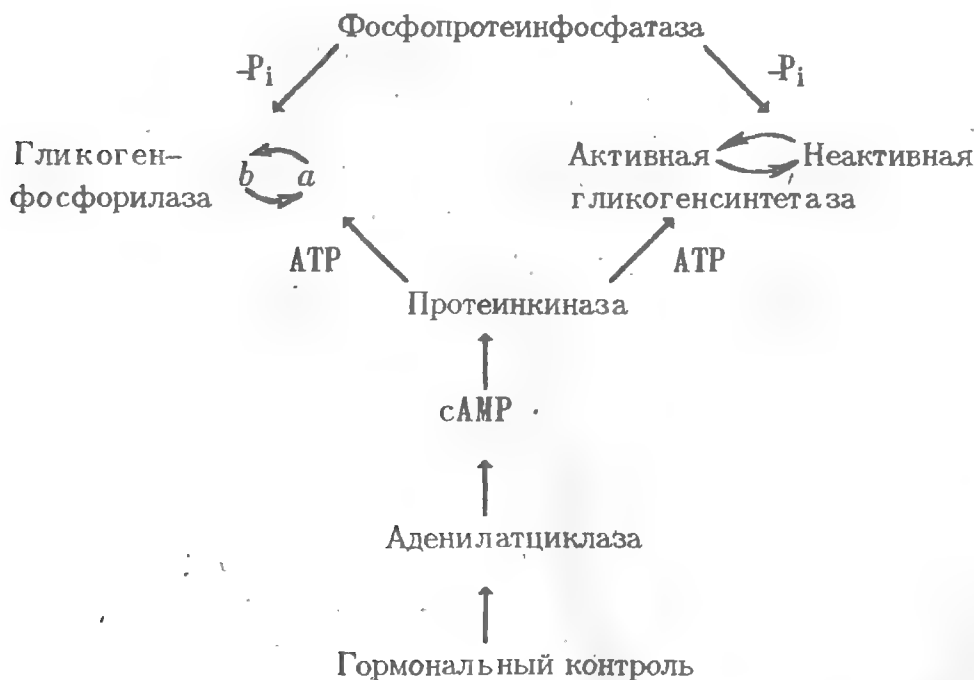


Таким образом, концентрация сАМР управляет активностью протеинкиназы, а через нее — активностью гликогенфосфорилазы, в конеч-

ном счете — мобилизацией энергии, запасенной клеткой в форме гликогена. В свою очередь, уровень сАМР определяется соотношением активностей аденилатциклазы — фермента, превращающего АТР в сАМР, и фосфодиэстеразы, гидролизующей сАМР до АМР. Активность аденилатциклазы зависит от ряда внешних факторов, среди которых особенно важен гормональный контроль. Итак, фосфорилирование фосфорилазы *b* и ее превращение в активный фермент — фосфорилазу *a* — есть результат целого каскада ферментативных реакций, управляемого весьма тонко. Как уже упоминалось, фосфорилирование — не единственный путь воздействия на активность фосфорилазы.

Активация фосфорилазы, как видно из рассмотренного выше цикла, должна сопровождаться снижением активности гликогенсинтетазы. Этот фермент также существует в двух формах, однако в этом случае активная форма не фосфорилирована. При фосфорилировании соответствующей протеинкиназой она превращается в неактивную гликогенсинтетазу.

Следовательно, изображенный выше цикл синтеза и фосфорилиза гликогена следует дополнить довольно сложной схемой взаимопревращений активных и неактивных форм ферментов, катализирующих эти процессы:



Необходимо иметь в виду, что и эта схема сильно упрощена. Выяснилось, что активность протеинкиназы может регулироваться кальмодулином — белком, связывающим ионы кальция, — и, следовательно, зависит от концентрации в клетке и этого вторичного мессенджера.

Аналогично, фосфорилированием и дефосфорилированием контролируется активность целого ряда других метаболических ферментов, в частности синтетазы жирных кислот, пируватдегидрогеназы. Важно подчеркнуть, что реакции фосфорилирования и дефосфорилирования коренным образом отличаются от аллостерической регуляции ферментов, поскольку они не находятся в прямой зависимости от биохимического статуса клетки и, следовательно, могут использоваться для изменения активности под воздействием внеклеточных сигналов, они удобны для регуляции на уровне организма. Известны и другие протеинкиназы, фосфорилирующие остатки серина или треонина в белках, в том числе независимые от cAMP или контролируемые cGMP, диацилглицерином.

Выбор остатка серина, подвергаемого фосфорилированию, может зависеть от последовательности аминокислот, которые его окружают. Так, cAMP-зависимая протеинкиназа быка фосфорилирует гидроксильную группу серина в последовательности



причем соседствующие остатки аргинина, видимо, направляют фермент.

Фосфорилирование по остаткам *тирозина*, которое катализируется специфическими протеинкиназами (тирозинкиназами), встречается значительно реже, чем фосфорилирование остатков серина и треонина, — на долю фосфотироина приходится около 0,1% всего связанного с белком фосфата. Однако биологическая роль этой реакции очень велика, так как она активно используется для *передачи сигналов* в биологических системах.

Так, инсулин, связываясь с рецептором — трансмембранным белком, вызывает активацию его домена, направленного в цитоплазму и являющегося *тирозинкиназой*. Тирозинкиназную активность индуцирует ряд факторов роста — белков, запускающих деление клеток по механизму, аналогичному описанному для инсулина. Рецепторы этих факторов — крупные трансмембранные белки — связывают их на наружной поверхности мембраны. Образование комплекса фактор — рецептор передает сигнал через трансмембранную часть рецептора на его цитоплазматический домен, являющийся тирозинкиназой. Активированная таким образом тирозинкиназа модифицирует внутриклеточные белки, передавая сигнал далее.

Тирозинкиназы фосфорилируют остатки тироина в некоторых внутриклеточных белках, вовлеченных в сложную систему регуляции клеточного деления, в которой также участвует и фосфорилирование белков по остаткам серина и треонина. Нарушение этой весьма слож-

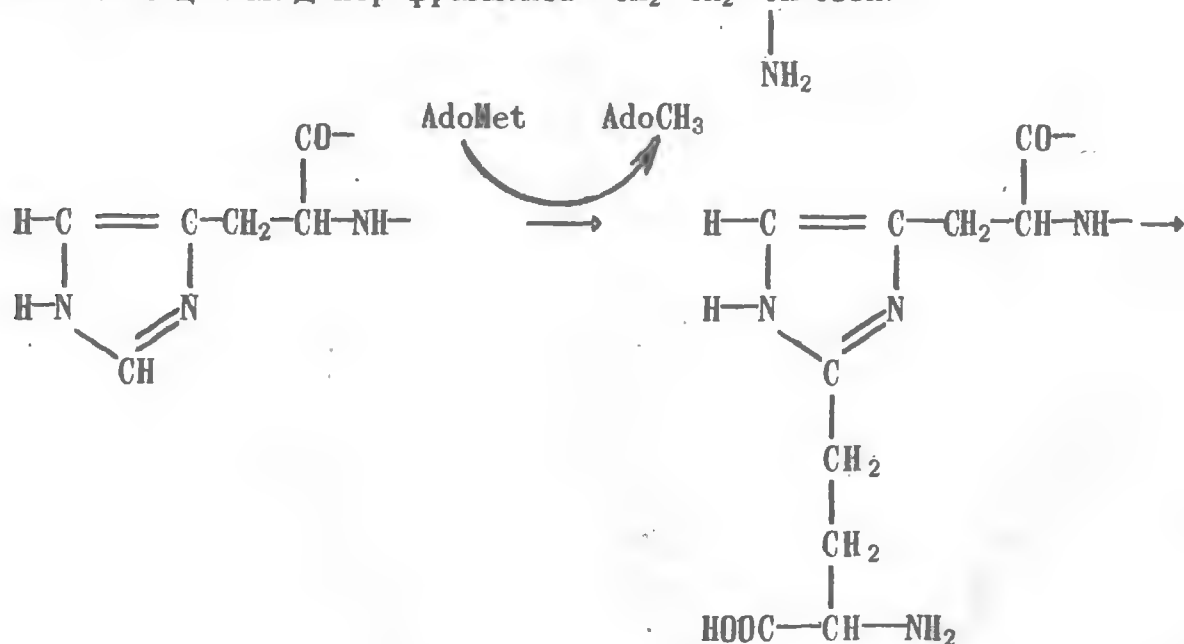
ной регуляторной сети может привести к неконтролируемому делению клеток, опухолевому росту. Характерно, что онкобелки, структурно близкие нормальным белкам животной клетки, но вызывающие ее трансформацию, превращение в опухолевую, нередко оказываются тирозинкиназами.

11.6. ADP-РИБОЗИЛИРОВАНИЕ

Реакция переноса ADP-рибозного остатка NAD на белки, катализируемая специфическими ферментами, используется для регуляции активности ряда ферментов, в том числе глутаминсинтетазы, где модифицируется остаток тирозина.

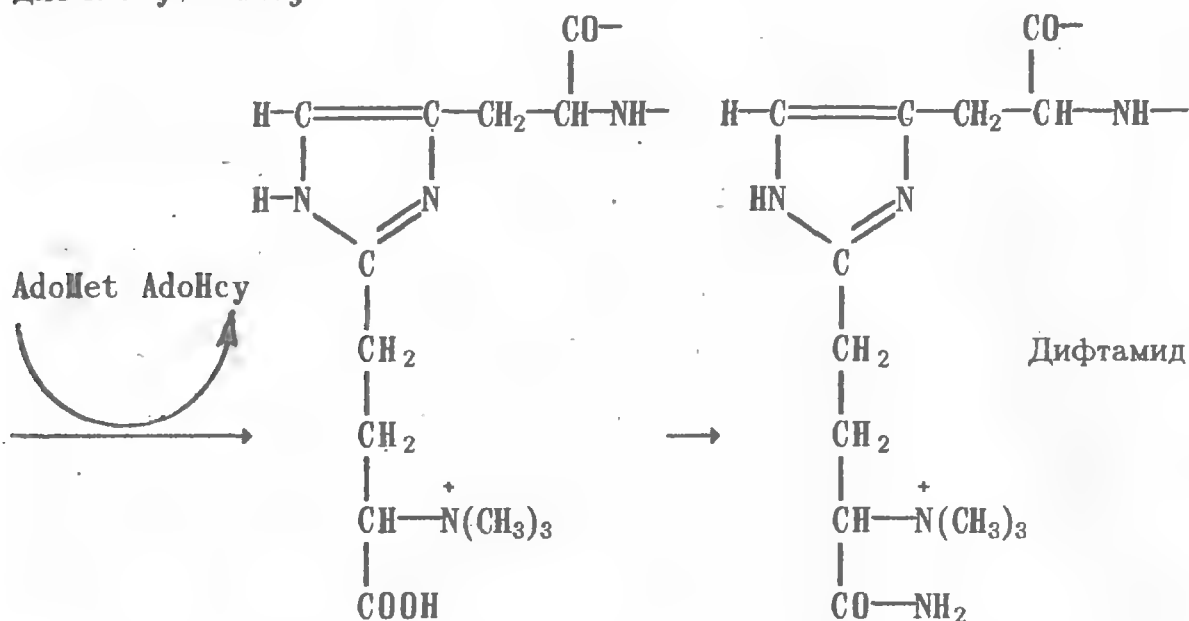
Аналогичную реакцию переноса ADP-рибозного фрагмента катализируют некоторые бактериальные токсины. Каталитический домен дифтерийного токсина, образующийся в результате ограниченного протеолиза, катализирует присоединение этого фрагмента к фактору элонгации EF-2 в клетках эукариот и архебактерий. Модификации подвергается производное гистидина (содержащееся в консервативном районе последовательности этого фактора) — дифтамид, в свою очередь образуемый многоступенчатой модификацией остатка гистидина.

На первом этапе аденозилметионин (AdoMet), обычно являющийся донором метильной группы, выступает при алкилировании имидазольного кольца как донор фрагмента $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$:



Затем происходит исчерпывающее метилирование аминогруппы присоединившегося фрагмента. В этом случае аденозилметионин явля-

ется источником метильных групп, превращаясь в аденозилгомоцистеин (AdoHcy). Модификацию завершает амидирование карбоксильной группы, которое протекает с одновременным гидролизом АТР и приводит к *дифталиду*:



ADP-рибозилирование дифтамида, катализируемое *дифтерийным токсином*, инактивирует фактор элонгации EF, прерывая тем самым трансляцию, что приводит к гибели клетки.

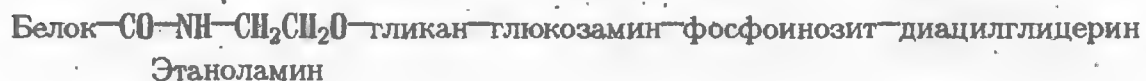
11.7. ЛИПОПРОТЕИНЫ

К липопротеинам в строгом смысле этого термина принадлежат белки, содержащие ковалентно связанные липиды. Однако традиционно к ним относят белки, участвующие в транспорте липидов и образующие с ними нековалентные комплексы, например липопротеины крови. Мы рассмотрим только такие липопротеины, которые отвечают строгому определению.

11.7.1. Липопротеины с С-концевым гликолипидом

Обнаружено около 30 белков, которые встраиваются в мембраны животных клеток за счет *гидрофобных взаимодействий* между липидом мембраны и своеобразно организованной С-концевой частью белка, представляющей собой *гликолипид* (так называемые "PIG-tailed"-белки — "белки со свиными хвостиками", от англ. Phospho-Inositol-Glycan). К ним принадлежат щелочная фосфатаза, глобулярная форма ацетилхолинэстеразы, высоковариабельный гликопротеин поверхности трипаносом, адгезионный белок нервных клеток и т.д.

По завершении биосинтеза полипептидной цепи С-концевой участок такого белка, содержащий от 17 до 31 остатка преимущественно гидрофобных аминокислот, отщепляется, заменяясь следующей структурой:



Гликолипидный фрагмент несколько различен у разных белков, отличаясь строением гликана, содержащего галактозу, набором жирных кислот в диацилглицериновом звене, среди которых отмечено присутствие пальмитиновой и миристиновой кислот.

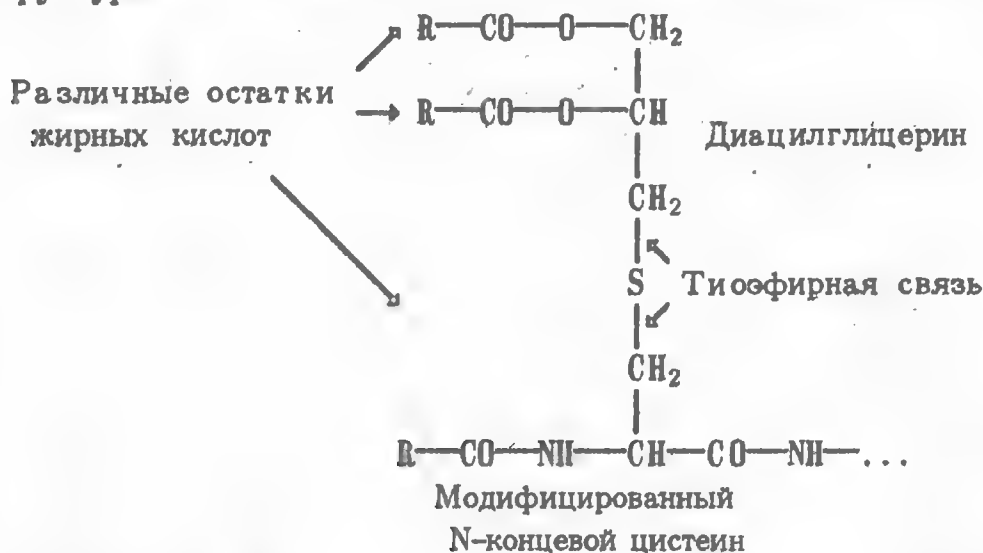
Весь гликолипидный фрагмент удаётся в некоторых случаях удалить при действии протеиназы. Связь между глюкозамином и фосфоинозитом расщепляется при действии азотистой кислоты. Особенно характерно отщепление липида при действии фосфолипаз D или C, которые гидролизуют соответственно фосфодизфирные связи между инозитом и фосфатидовой кислотой или фосфоинозитом и диацилглицерином, что приводит к отделению белка от мембраны. Имеются сведения, что фосфолипаза C каким-то образом участвует в механизме действия инсулина, отщепляя гликолипидный фрагмент от липопротеинлипазы. В результате последняя утрачивает связь с наружной мембраной жировых клеток, что сказывается на катаболизме триглицеридов. Во всяком случае, очевидно, что в рассматриваемых белках гликозил-фосфатидилинозит не является инертным "якорем".

11.7.2. Липопротеины с N-концевой липидной группировкой

Известны два способа присоединения липидной группировки к аминному концу белка. Простейший состоит в N-миристоиллировании — переносе остатка миристиновой кислоты — $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$ от миристоилкоэнзима A на α -аминогруппу N-концевого остатка глицина белка. Гидрофобный миристоильный остаток участвует в удерживании белка в липидном слое мембраны или, возможно, связывается специальным белком-рецептором.

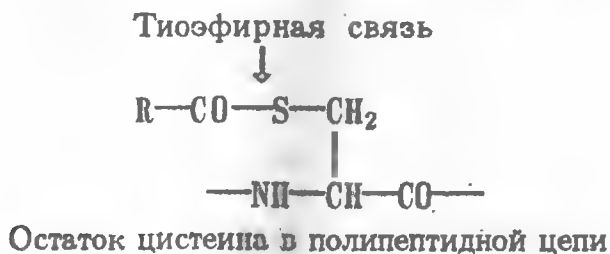
Некоторые белки микроорганизмов, например β -лактамаза *Bacillus cereus*, взаимодействуют с липидами мембран при помощи своеобразного липидного якоря. Последний формируется на аминном конце полипептидной цепи после отщепления от нее сигнального пептида, обеспечивающего перенос полипептидной цепи белка через мембрану. В таких белках аминоконцевое положение неизменно занимает остаток цистеина. К его сульфгидрильной группе тиозфирной связью присоединяется остаток диацилглицерина, затем еще один остаток жирной

кислоты ацилирует α -аминогруппу цистеина, что приводит к следующей структуре:



Сосредоточение сразу трех остатков жирных кислот у N-концевого цистеина делает аминоконцевую часть полипептидной цепи белка весьма гидрофобной, чем и обусловлена возможность его взаимодействия с липидами мембраны. Вся эта конструкция надежно удерживает белок связанным с мембраной, причем белковая глобула полностью погружена в среду, прилегающую к мембране, например в периплазматическое пространство бактериальных клеток.

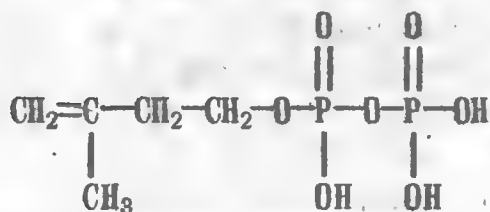
Сказанным не ограничиваются структурные типы липопротеинов. По-видимому, белок резус-фактора (Rh-белок), локализованный в мембране эритроцитов человека, содержит несколько (до четырех) остатков пальмитиновой кислоты, присоединенных тиоэфирными связями к сульфгидрильным группам цистеина, что делает его очень гидрофобным:



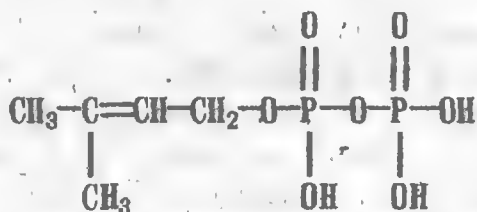
11.7.3. Пренилированные белки

Реакции *S*-пренилирования, заключающейся в присоединении изопреноидов к атому серы остатка цистеина, который локализован в C-концевом участке полипептидной цепи, подвергается около 100 белков, в частности белок Das (см. гл. 12). Первоисточником пренильных групп

пировок является изопентенил-пирофосфат, изомеризующийся с перемещением двойной связи в диметилаллил-пирофосфат:

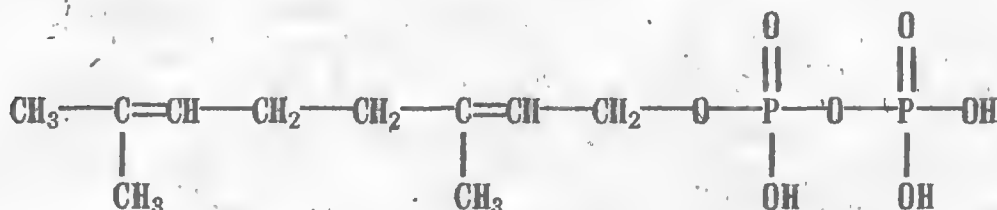


Изопентенил-пирофосфат (C₅)



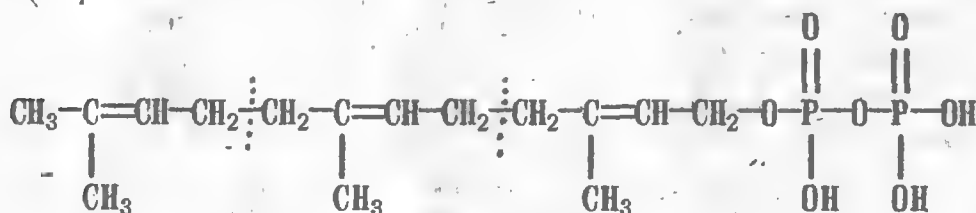
Диметилаллил-пирофосфат (C₅)

Конденсация этих двух молекул с элиминированием пирофосфата дает геранил-пирофосфат:

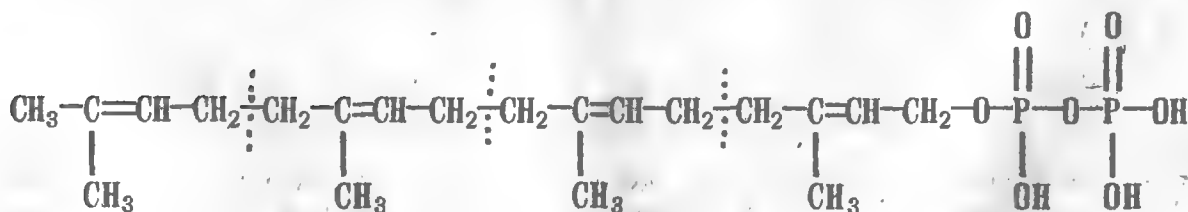


Геранил-пирофосфат (C₁₀)

Далее молекула наращивается последовательным присоединением изопентенил-пирофосфата по такому же механизму, причем на каждом шаге присоединяется C₅-звено. Это приводит к фарнезил-пирофосфату (C₁₅), являющемуся также предшественником стероидов и каротиноидов, и геранил-геранил-пирофосфату (C₂₀):



Фарнезил-пирофосфат (C₁₅)

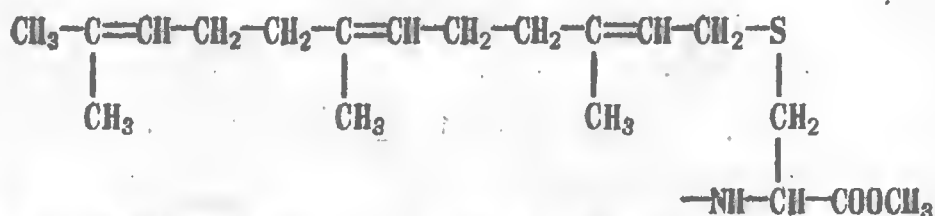


Геранил-геранил-пирофосфат (C₂₀) (пунктиром отмечены границы повторяющихся C₅-звеньев)

Фарнезильная или геранил-геранильная группы с отщеплением пирофосфата переносятся на атом серы остатка цистеина, который расположен вблизи С-конца полипептидной цепи в последовательности

$C-A-A-X$ (так называемом CAX -боксе), где C — остаток цистеина, A — остатки алифатических аминокислот, X — C -концевая аминокислота, определяющая, какой из двух типов реакции пренилирования осуществится. Если X — серин, метионин или глутамин, то к цистеину присоединяется фарнезил (C_{15}), если X — лейцин, то происходит присоединение геранил-геранила (C_{20}).

Пренилирование белков включает в себя следующую цепь превращений. Пренилтрансфераза переносит пренильный остаток соответствующего пренил-пирофосфата на SH -группу остатка цистеина в белке, имеющем на C -конце CAX -бокс. Затем специфическая пептидаза отщепляет выполнившую роль сигнала последовательность $A-A-X$, после чего с участием метилтрансферазы метильная группа S -аденозилметионина переносится на карбоксил пренилированного цистеина, превращая его в метиловый эфир:



Метиловый эфир S -фарнезил-цистеина на C -конце пренилированного белка

Очевидно, что присоединение к белку крупной гидрофобной пренильной группировки благоприятствует его включению в цитоплазматическую мембрану. При этом существенно, что от типа пренильной группы зависит ориентация белка в мембране — фарнезилированные белки встраиваются во внешнюю мембрану, белки же, содержащие геранил-геранильный остаток, — во внутреннюю мембрану, обращенную к цитоплазме. Впрочем, у этого правила могут быть исключения, кроме того, в адресовании пренилированных белков участвуют, вероятно, и другие элементы их структуры. Таким образом, реакция пренилирования — один из процессов, определяющих локализацию белков в биологических структурах, их *топогенез*.

11.8. ОГРАНИЧЕННЫЙ ПРОТЕОЛИЗ

Ограниченный протеолиз — важная реакция посттрансляционной модификации белка. Обычный "неограниченный", глубокий протеолиз — расщепление белка протеиназами — протекает по принципу "все или ничего". Компактный белок, как правило, относительно устойчив к действию протеиназ, поскольку в нем практически нет необходимых для связывания протеолитических ферментов протяженных "открытых" участков полипептидной цепи. Поэтому атака на первых

порах ограничивается расщеплением отдельных петель, концевых участков белка. Если же протеолизу подвергается "внутренний" участок полипептидной цепи, ставший доступным, например, за счет частичной (и обратимой) денатурации белковой глобулы, то пространственная структура дестабилизируется, белок-субстрат необратимо денатурирует и вся полипептидная цепь оказывается доступной протеолитической атаке. Результатом является глубокий гидролиз с образованием коротких фрагментов. При таком ходе протеолиза в гидролизате присутствуют исходный белок, количество которого постоянно уменьшается, и низкомолекулярные пептидные продукты гидролиза, содержание которых постоянно нарастает, промежуточные же продукты наблюдать не удается.

Ограниченный протеолиз, при котором процесс задерживается или полностью останавливается на промежуточных продуктах, возможен лишь тогда, когда продукты протеолиза сохраняют *компактность*, например при отщеплении фрагмента какого-либо из концов пептидной цепи, разрыве петли на поверхности глобулы или при расщеплении пептидной цепи между достаточно стабильными доменами белка.

Ход ограниченного протеолиза, его результат решающим образом зависят от *особенностей структуры белка-субстрата*. Ввиду этого нередко одинаковые или очень близкие результаты дает применение различных протеиназ, место действия которых определяется особенностями пространственного строения субстрата. Если в разрешенном для атаки участке (шарнирный участок) последовательность аминокислотных остатков согласуется со специфичностью атакующей протеиназы, то эффективность процесса возрастает. Именно так обстоит дело при посттрансляционной модификации белков протеиназами.

Рассмотрим несколько типичных процессов ограниченного протеолиза.

11.8.1. Формирование белка неканонической структуры.

Вносинтез инсулина

Инсулин, построенный из двух полипептидных цепей А и В, содержащих соответственно 21 и 30 аминокислотных остатков и соединенных между собой дисульфидными связями, слишком мал, чтобы сформировать стабильную глобулярную структуру с достаточной эффективностью. Действительно, удается получить инсулин *рекомбинацией* раздельно синтезированных А- и В-цепей, причем остатки цистеина, окисляясь, образуют свойственную нативному белку систему дисульфидных связей. Однако такой процесс происходит медленно и дает, как правило, невысокий выход инсулина.

Гораздо легче образует третичную структуру предшественник инсулина — *проинсулин*, в полипептидной цепи которого "будущие" А- и В-цепи инсулина соединены пептидом С в последовательности В—С—А. Такой белок, содержащий в одной полипептидной цепи около 90 аминокислотных остатков, сворачивается в компактную структуру, далее следует замыкание дисульфидных мостиков, стабилизирующее молекулу в целом, после чего специальная протеиназа "вырезает" пептид С. Точки воздействия этой протеиназы предопределены двумя факторами — пространственной структурой проинсулина и присутствием в его полипептидной цепи двух сигналов — двух пар катионных аминокислот, расположенных в последовательности таким образом:

В-цепь—Arg—Arg—С-пептид—Lys—Arg—А-цепь

Процессирующая такой предшественник протеиназа узнает пары аминокислот с катионными боковыми группами типа Arg—Arg, Lys—Arg и т.п. и расщепляет пептидную связь на С-конце таких пар. В результате будет вырезан пептид С вместе с последовательностью Lys—Arg на С-конце и освободятся цепи А и В, причем на С-конце цепи В окажутся два остатка аргинина, которые необходимо отщепить. Это выполняет специализированная металлокарбоксипептидаза с оптимумом действия в слабокислой среде.

Заметим, что сочетание действия протеиназы, гидролизующей пептидные связи после пары катионных аминокислот (такие ферменты обнаружены у животных и дрожжей), и карбоксипептидазы, отщепляющей затем эти аминокислоты (по специфичности фермент близок карбоксипептидазе В), используется в биосинтезе коротких пептидов, например энкефалина. Специфичность действия такой системы достаточно высока, и процессинг длинных предшественников происходит, видимо, еще до образования стабильной пространственной структуры. Так, пептидная цепь проопиомеланокортина, содержащая 235 аминокислотных остатков, расщепляется по такому способу в семи местах, образуя эндорфин, адренотропный гормон, α - и γ -меланоцитостимулирующие гормоны и другие физиологически активные пептиды.

11.8.2. Разъединение белковых глобул в полибелках

В ряде случаев несколько структурно и функционально различных белков синтезируется первоначально как одна полипептидная цепь очень большой длины, отдельные участки которой независимо друг от друга свертываются в белковые глобулы, образуя так называемый *полибелок*. Так, например, синтезируются ферменты биосинтеза жир-

ных кислот. Особенно характерен синтез полибалков для ретровирусов. В дальнейшем происходит разрезание специфическими протеиназами пептидных перетяжек между отдельными глобулами, после чего последние функционируют независимо. Так, в частности, разделяются компоненты полибалка вируса иммунодефицита человека. Видимо, точность расщепления полипептидных перетяжек в полибелке в этом случае столь существенна, что этот процесс не всегда может быть доверен протеиназам клетки-хозяина. Полибелок содержит весьма специфичную протеиназу вируса иммунодефицита человека, отдаленно родственную пепсину, которая узнает характерные последовательности аминокислот в перетяжках и точно разрезает их. Предполагают, что избирательное ингибирование таких протеиназ может быть использовано как один из способов борьбы с вирусной инфекцией.

11.8.3. Разделение доменов

Эта реакция используется, в частности, как необходимый этап в механизме действия ряда белковых токсинов, вырабатываемых микроорганизмами. Так, дифтерийный токсин синтезируется как протоксин, построенный из одной полипептидной цепи, которая образует по крайней мере два структурно и функционально автономных домена. Один из них ответствен за связывание токсина с рецептором мембраны атакуемой клетки, второй — представляет собой фермент, катализирующий перенос аденозиндифосфатрибозного фрагмента NAD на фактор элонгации EF, который при этом инактивируется. Комплекс токсин — рецептор, обязанный своим образованием связыванию первого домена с рецептором, после интернализации (втягивания внутрь клетки) оказывается в окруженном мембраной пузырьке — везикуле.

Для того чтобы получить возможность действия на фактор элонгации EF, каталитический домен должен покинуть везикулу, оказаться в цитоплазме. Токсин содержит структуру, позволяющую каталитическому домену проникнуть через мембрану, однако и после этого он еще сохранит связь с "узнающим" доменом. Следовательно, он не сможет покинуть везикулу, пока протеиназа подходящей специфичности не расщепит междоменный участок пептидной цепи. Это высвобождает каталитический домен и позволяет ему сблизиться с фактором EF.

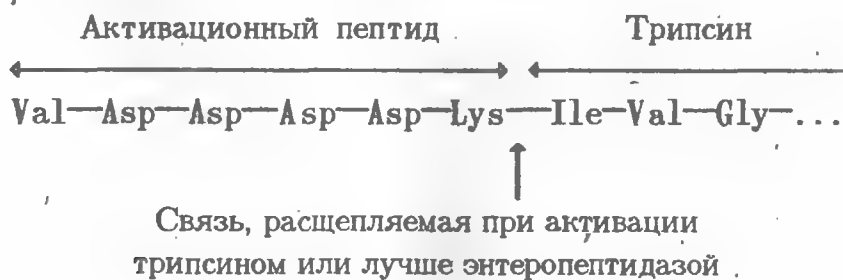
Расщепление пептидной связи между α - и β -субъединицами рецептора инсулина необходимо для активации этого белка. Соединяющий (шарнирный) участок пептидной цепи содержит очень характерную сигнальную последовательность Arg-Lys-Arg-Arg-Xaa, в который связь Arg-Xaa расщепляется специфическим протеолитическим ферментом. Найдены носители аномального гена рецептора инсулина, в

котором отмеченная последовательность заменена на Arg—Lys—Arg—Ser—Xaa. Замена Arg на Ser делает белок устойчивым к процессирующей протеиназе, домены не разделяются, что приводит к образованию неактивного рецептора. Гомозиготные носители такого мутантного гена страдают диабетом, который не компенсируется инсулином.

Интересно, что аналогично построенная сигнальная последовательность четырех катионных аминокислот определяет протеолитическую активацию гемагглютинаина вируса гриппа, а также созревание гликопротеина поверхности вируса иммунодефицита человека.

11.8.4. Активация предшественников ферментов

Многие ферменты, в особенности гидролазы, синтезируются в виде неактивных предшественников — *проферментов*, или *зимогенов*. Наиболее изучена активация предшественников панкреатических сериновых протеиназ — трипсиногена и химотрипсиногена. В обоих случаях пептидная цепь фермента удлинена с аминного конца на несколько аминокислотных остатков — *активационный пептид*, протеолитическое отщепление которого превращает практически неактивный зимоген в активную протеиназу. Так, в трипсиногене быка аминоконцевая последовательность имеет такую структуру:



Гидролиз трипсином именно пептидной связи Lys—Ile определяется прежде всего ее доступностью — в молекуле трипсиногена содержится целый ряд пептидных связей, образованных остатками аргинина или лизина и атакуемых трипсином в денатурированном зимогене, однако в нативном белке расщепляется первой именно эта связь. При активации трипсиногена образуется трипсин, способный активировать другие молекулы профермента, так что реакция в целом оказывается *аутокаталитической* и протекает с резким ускорением.

Характерно, что скорость активации, обеспечиваемая трипсином, *in vivo* все же оказывается недостаточной и активация инициируется специальным протеолитическим ферментом — *энтеропептидазой* (энтерокиназой), который содержится в секрете двенадцатиперстной кишки

и активирует трипсиноген примерно в 1000 раз быстрее трипсина. Столь высокая специфичность энтеропептидазы обусловлена тем, что фермент узнает в трипсиногене предшествующую остатку лизина гроздь из четырех остатков аспарагиновой кислоты.

Отщепление активационного пептида от молекулы трипсиногена влечет за собой цепь изменений в пространственной структуре продукта активации. Аналогичные изменения претерпевает и продукт активации химотрипсиногена, хотя активационный пептид в этом случае выглядит совершенно иначе и сохраняет ковалентную связь с ферментом за счет дисульфидной связи. Освободившаяся при активации аминоконцевая группа остатка изолейцина (аминоконцевого в трипсине) протонируется. Катионная аммонийная группа *втягивается вглубь глобулы фермента* вследствие стремления гидрофобных боковых групп остатков изолейцина и валина уменьшить поверхность контакта с водой.

Этому способствует образование ионной пары между α -аммонийной группой изолейцина и отрицательно заряженным карбоксилат-ионом боковой группы остатка Asp-194, причем разрывается существовавшая в зимогене ионная пара Asp-194 — His-40. Смещение карбоксильной группы остатка Asp-194 приводит к локальным структурным перестройкам вблизи зоны связывания субстрата, в частности завершается формирование гидрофобного кармана за счет движения боковой цепи остатка Met-192. Видимо, немалую роль могут играть и некоторые уточнения в размещении функциональных групп каталитического центра. Заметим, что этот центр, по крайней мере в грубом приближении, предсуществует еще в проферменте, который обнаруживает (по небольшим субстратам) около 0,01% активности, присущей активному трипсину.

Активация трипсиногена сопровождается как бы *фиксацией*, более точной организацией около 15% пространственной структуры — соответствующие атомы испытывают значительные колебания в молекуле профермента, но закрепляются в трипсине. Таким образом, расщепление пептидной связи Lys-Ile запускает весьма сложный механизм локальных перестроек, активирующий молекулу. Вслед за описанной начальной реакцией, определяющей образование активного фермента, наблюдается гидролиз других пептидных связей. Он приводит к образованию новых молекулярных форм трипсина, иногда несколько отличающихся от первичного продукта активации функциональными свойствами, например деталями специфичности. Сходно протекает активация химотрипсиногена, инициируемая также трипсином. Последующее расщепление некоторых связей в активном химотрипсине другими его молекулами дает целый набор молекулярных форм фермента.

Такой же механизм положен в основу активации протеиназ системы

свертывания крови, в которых при протеолизе единой полипептидной цепи обнажается α -аминогруппа N-концевого остатка в каталитическом домене активного фермента, что запускает, по-видимому, такую же цепь изменений структуры, активирующую фермент.

Разница состоит в том, что аминоконцевой район профермента, подчас очень крупная структура, сохраняет связь с собственно каталитическим ядром за счет дисульфидных и, вероятно, нековалентных взаимодействий. Это позволяет сообщить протеиназе новые функциональные особенности, например способность к связыванию с липидами мембран через ионы кальция за счет остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты (см. разд. 11.3).

В предшественниках других протеиназ — пепсиногене и прокарибосипептидазе — отщепляемый при активации (соответственно, пепсином или трипсином) пептид содержит около 40 аминокислотных остатков и, видимо, играет роль своеобразного экрана, прикрывающего активный центр фермента. Отщепление этого экрана, которое не требует строго однозначного протеолиза, как в случае рассмотренных выше сериновых протеиназ, и может быть результатом разрыва любой пептидной связи в последовательности, соединяющей активационный пептид с будущим ферментом. Отсюда неоднозначность активации, которая может приводить к смеси активных ферментов, различающихся длиной и аминоконцевыми остатками (так называемые *растрепанные концы*).

Биологический смысл активации проферментов очевиден: она позволяет накопить значительные количества предшественника, чрезвычайно быстро превращаемого в активный фермент в результате всего лишь одной реакции — *расщепления единственной пептидной связи*. Синтез значительных количеств фермента *de novo* потребовал бы гораздо большего времени, что невыгодно, особенно в процессах пищеварения. В то же время накопление активных протеиназ внутри клетки может оказаться для нее далеко не безобидным. Биосинтез профермента позволяет снять и эту проблему.

Не следует думать, что активация зимогенов характерна лишь для ферментов животных. Обнаружено, что в виде предшественников синтезируются практически все протеиназы бактерий.

11.9. ПРОЦЕССИНГ АМИНОКОНЦЕВОГО РАЙОНА БЕЛКА

У многих белков подвергается модификации *аминоконцевой район*. Как известно, в белках прокариот, в митохондриях и хлоропластах остаток метионина, инициирующий трансляцию, формилирован. N-Формильная группа удаляется ферментом *фармиллазой*. У эукариот

трансляция инициируется метионином. После того как длина пептидной цепочки, еще связанной с рибосомой, достигнет примерно 20 аминокислотных остатков, инициирующий метионин может отщепляться специальной *аминопептидазой*. (Однако это не обязательно, и примерно у половины цитоплазматических белков животных аминоконцевой метионин сохраняется.)

Среди других N-концевых остатков доминируют относительно небольшие — аланин, серин и треонин. По-видимому, это обусловлено особенностями аминопептидазы, предпочтительно отщепляющей N-концевой метионин, если за ним следует аминокислота с небольшой боковой цепью. В тех случаях, когда аминокислота, следующая за концевым метионином, имеет объемистый радикал, метионин не отщепляется, сохраняясь на аминном конце белка.

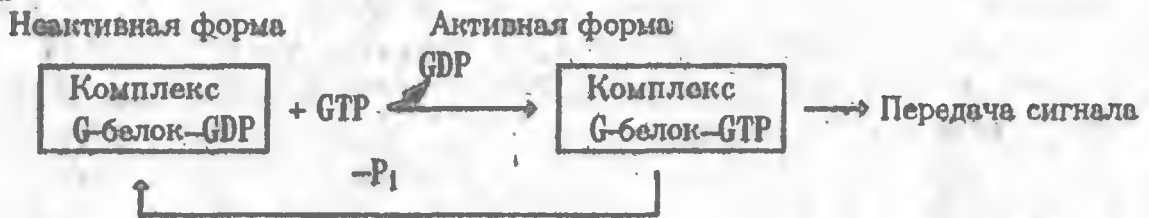
Есть основания полагать, что природа N-концевой аминокислоты как-то связана с устойчивостью белка к внутриклеточному протеолизу. По-видимому, этим обусловлена и распространенность блокирования аминоконцевого остатка *ацетилированием* — в общей сложности ацетилирован аминный конец у примерно 50% растворимых белков клеток млекопитающих. В этой реакции, катализируемой N- α -ацетилтрансферазой, донором ацетильной группы служит ацетилкоэнзим А. Чаще всего встречаются на N-конце белков эукариот ацетилсерин, ацетилаланин, ацетилметионин. В то же время известен и фермент, способный отщеплять от N- α -ацетилированных белков ацетиламинокислоту, например ацетилаланин. Существенно, что отмеченные модификации обеспечивают многообразие аминных концов полипептидных цепей, которые в отсутствие таких реакций были бы неизменно представлены метионином. Не исключено, что отщепление N-концевого метионина важно и потому, что делает возможным многократное использование этой инициирующей аминокислоты, биосинтез которой весьма не прост.

ГЛАВА 12

G-БЕЛКИ

Обширному классу GTP-связывающих, или *G-белков*, принадлежит особо важная роль в передаче сигнала в клетку и внутри клетки. Их функциональное состояние, иначе говоря, способность к передаче сигнала другим белкам, определяется тем, содержат ли они связанную молекулу гуанозинтрифосфата (GTP) или продукт ее гидролиза — гуанозиндифосфат (GDP). Сами эти белки обладают собственной GTPазной активностью, поэтому G-белок, активированный нековалентным

присоединением GTP, постепенно гидролизует этот эффектор до GDP, возвращаясь при этом в неактивную форму:



Таким образом, важнейшей особенностью G-белков является способность удерживать активную конформацию и участвовать в передаче сигнала в течение определенного времени, что зависит от их GTPазной активности, а также от действия белковых факторов, которые либо способствуют обмену GDP на GTP и, следовательно, переводу белка в активное состояние, либо, напротив, усиливают GTPазную активность G-белка и, значит, ускоряют его переход в неактивный комплекс с GDP. Структурно-функциональные особенности G-белков иллюстрируются следующими примерами.

12.1. БЕЛОК *c-H-ras*

К G-белкам принадлежат некоторые онкобелки, в частности *c-H-ras*-онкобелок человека. G-белки, кодируемые мутантными генами семейства *ras*, нередко обнаруживаются в опухолях. Нормальный ген *c-H-ras* кодирует так называемый белок p21 с молекулярной массой 21 кДа, локализованный в цитоплазматической мембране и являющийся потенциальным предшественником онкобелка — протоонкобелка. Его функция в нормальной клетке состоит, по-видимому, в том, что он воспринимает извне стимулирующие клеточный рост сигналы и передает их на белки-мишени внутри клетки, инициируя ее рост и деление.

К комплексу белка p21 с GTP присоединяется белок GAP (GTPазе Activating Protein), который усиливает присущую этому комплексу GTPазную активность. Именно тройной комплекс p21 — GTP — GAP и является передатчиком сигнала. В то же время в нем происходит гидролиз GTP до GDP, катализируемый белком p21. Последний сам по себе является очень медленно действующей GTPазой (ускорение гидролиза гуанозинтрифосфата примерно в 1000 раз, время полужизни комплекса p21 — GTP — около 1 ч). GTPазная активность резко (по некоторым оценкам, в 100 000 раз) возрастает при образовании тройного комплекса с активирующим белком GAP. Существенно, что в результате гидролиза GTP до GDP комплекс с GAP распадается и передача сигнала прекращается.

Таким образом, от эффективности гидролиза GTP зависит продолжительность действия сигнала, G-белок как бы содержит внутренний датчик времени, регулируемый за счет взаимодействия с GAP. Понятно, что применительно к отдельно взятой молекуле можно говорить лишь о большей или меньшей вероятности расщепления GTP за определенный промежуток времени. Однако, поскольку в передаче сигнала в конкретной биологической системе участвует множество таких молекул, гидролиз GTP как бы задает время действия G-белка, т.е. продолжительность сигнала.

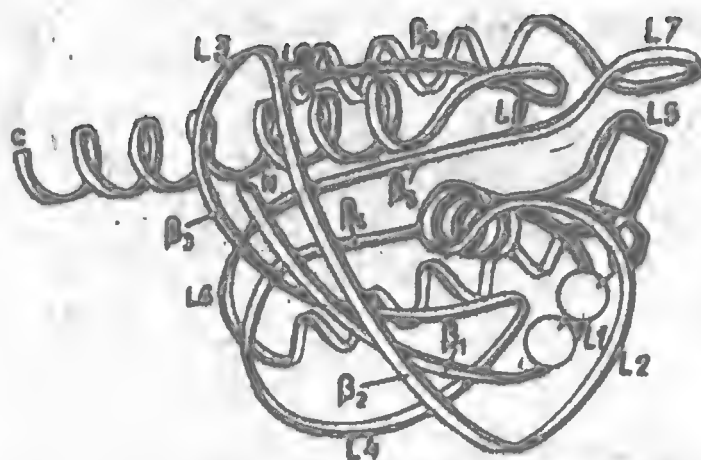
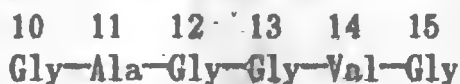


Рис. 12.1. Строение c-H-гиз балка р21 человека (остатки 1-171)

Видны четыре α -спирали, β -структурные участки β_1 - β_6 и петли L1-L8. Прямоугольником, пятиугольником и двумя кружками показано положение связанного GDP

Белок p21 содержит 189 аминокислотных остатков в одной пептидной цепи. Последняя образует шесть β -структурных отрезков и четыре α -спирали (рис. 12.1), причем для C-концевой половины белка характерна чередующаяся укладка элементов вторичной структуры β - α - β - α - β , напоминающая структурный мотив нуклеотидсвязывающего домена дегидрогеназ. Из десяти петель, соединяющих α -спиральные и β -структурные участки, пять (L1, L2, L4, L9 и L10) образуют карман, в котором связываются GDP и GTP, причем с белком взаимодействуют и основание — гуанин, и рибоза, и фосфатные группы.

Петля L1, соединяющая N-концевой β -структурный отрезок и первую α -спираль, содержит последовательность:



Она как бы "оседлывает" фосфоэфирную связь между β - и γ -фосфатными группами субстрата, составляя, очевидно, часть GTPазного каталитического центра. В вирусных белках, принадлежащих к тому же семейству и построенных таким же образом, концевой (γ) фосфат GTP внутримолекулярно переносится на гидроксил остатка Thr-59, а не на воду (так называемое аутофосфорилирование). Следует подчеркнуть, что с каталитическим центром сближен участок связывания активирующего белка — GAP.

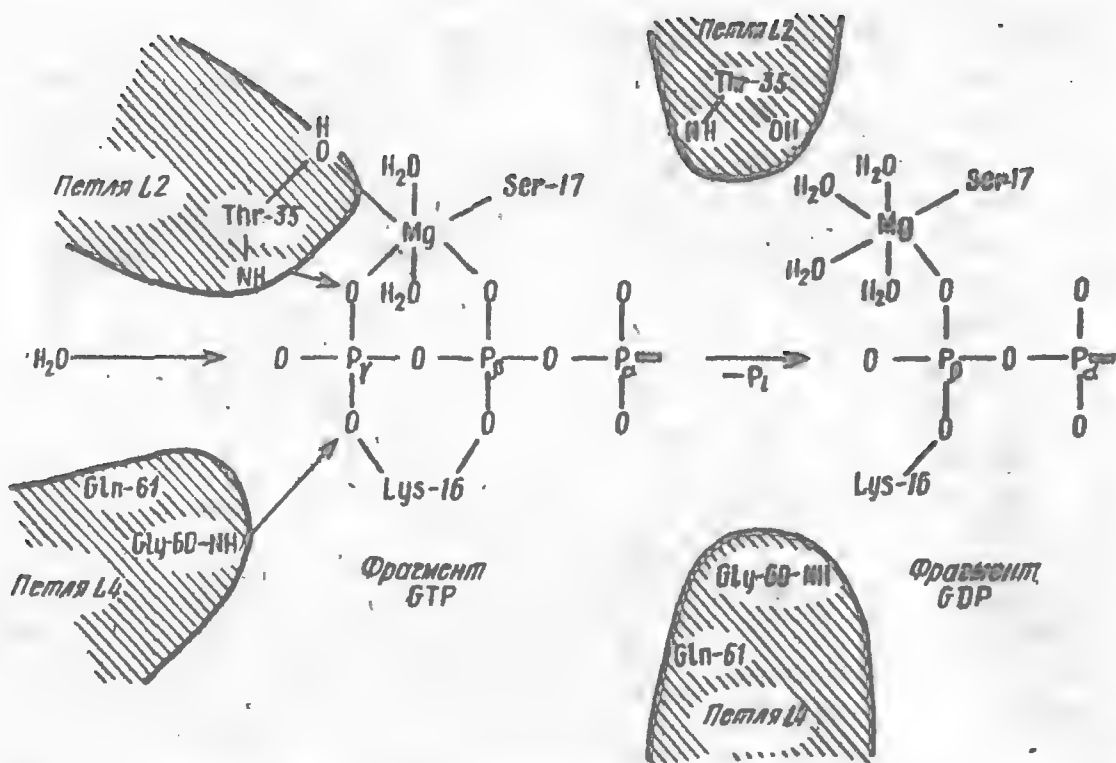


Рис. 12.2. Изменения во взаимодействии между нуклеотидом и G-белком, сопровождающие гидролиз GTP до GDP.

Показаны только три- и дифосфатные фрагменты нуклеотидов. Молекула воды, которую активируют взаимодействия с остатками глутамина Gln-61 и его окружением, атакует связанную белком молекулу GTP, концевой γ -фосфатный остаток которой связан с NH-группами остатков треонина Thr-35 в петле L2 и глицина Gly-60 в петле L4. Отщепление концевой γ -фосфатной группы приводит к образованию GDP. В результате Thr-35 и Gly-60, а следовательно петли L2 и L4, утрачивают непосредственный контакт с лигандом — молекулой GDP. Это вызывает изменение конформации петель, неблагоприятное для взаимодействия G-белка с белком, который участвует в передаче сигнала.

В гидролизе гуанозинтрифосфата участвует молекула воды, которая образует водородную связь с карбонильной группой Thr-35 и активируется за счет взаимодействия с другими функциональными группами каталитического центра. Однако в свободном G-белке эти участки активного центра существуют в виде нескольких конформеров, из которых способен активировать указанную молекулу воды лишь один, чем и объясняется весьма низкая эффективность катализа. По-видимому, в комплексе *ras*-белка с активирующим белком (GAP) закрепляется именно эта конформация, что и влечет за собой резкое ускорение гидролиза GTP.

Гидролиз GTP, связанного в активном центре G-белка, приводит к локальным изменениям структуры в районе контакта с β - и γ -фосфатными группами GTP (рис. 12.2). Видимо, за отщеплением γ -фосфатной

группы GTP следует приближение подвижных элементов белковой структуры к β -фосфату GDP, как бы заполнение образовавшегося "зазора". Заметно изменяется, в частности, укладка петель L2 (остатки 26—36) и L4 (остатки 59—65), а также способ связывания иона магния, взаимодействующего с активным центром белка p21 и GTP или GDP. Поскольку эти же петли обеспечивают взаимодействие с активирующим белком GAP, такой конформационный переход нарушает контакт p21 — GAP, прерывая тем самым передачу сигнала.

C-концевой фрагмент c-H-ras-белка, взаимодействующий, как предполагают, с рецептором, находящимся в мембране, соединен с описанным выше "каталитическим" доменом длинной α -спиралью, которая, видимо, участвует в передаче сигнала. У всех белков семейства *ras* на карбоксильном конце содержится характерная последовательность СААХ (где С — цистеин, А — алифатическая аминокислота), которая является сигналом для пренилирования тиоловой группы Cys-186 с последующим отщеплением C-концевого трипептида. Такая посттрансляционная гидрофобизация C-конца *ras*-белка (см. гл. 11) необходима для его присоединения к цитоплазматической стороне клеточной мембраны. *ras*-Белки, лишенные этой структуры, трансформирующим действием на клетки не обладают, хотя и сохраняют способность связывать и гидролизовать GTP.

Белки, обеспечивающие ввод и вывод сигнала, передаваемого белком p21, пока строго не идентифицированы, хотя есть основания полагать, что одним из них является белок GAP, который в свою очередь взаимодействует с рецептором факторов роста. Видимо, другой белок катализирует обмен GDP на GTP — процесс, весьма медленно протекающий в комплексе p21 — GDP.

Таким образом, сравнительно небольшой c-H-ras-белок вовлечен в сложную систему межмолекулярных взаимодействий, реализация которых решающим образом зависит от присутствия связанной им молекулы GTP и скорости ее гидролиза. Нетрудно понять, что столь сложная функция белка может легко нарушаться мутациями, затрагивающими отдельные аминокислотные остатки в нормальной белке — *protooncogene*. Вследствие такого нарушения функциональных свойств мутантный белок может становиться *собственно онкогеном*.

Так, замещение остатка Gly-12 в петле, входящей в каталитический центр, любой аминокислотой, кроме пролина, резко снижает GTPазную активность, причем она перестает усиливаться за счет взаимодействия с GAP-белком. Как показал рентгеноструктурный анализ с применением метода, позволяющего наблюдать за гидролизом GTP в динамике, мутация не вызывает крупных изменений в конформации зоны связывания GTP. Например, при замене Gly-12 $\rightarrow$ Val затрагиваются лишь

позиции остатков Gly-60, Thr-38 и Gln-61, окружающих γ -фосфат GTP. В результате, однако, мутантный белок крайне медленно гидролизует GTP и как бы перестает "выключаться", продолжая посылать в клетку стимулирующие сигналы даже тогда, когда они не нужны, в отсутствие внешнего сигнала. Таким образом, белок *c-H-ras* становится способным трансформировать нормальные клетки в опухолевые, т.е. приобретает *трансформирующую активность*.

Трансформирующую активность и, следовательно, превращение протоонкогена в онкоген вызывают и замены аминокислотных остатков 116 и 119, участвующих в связывании гуанинового фрагмента GTP, а также остатков 59, 61 и 63, которые могут влиять на конформацию петли, включающей остаток глицина Gly-12, снижая этим GTPазную активность.

В то же время аминокислотные замены на участке 35—40 снижают способность активированного *c-H-ras*-белка к трансформации клеток, хотя и не изменяют GTPазной активности или связывания GTP или GDP. По-видимому, этот участок вовлечен во взаимодействие с белком-мишенью, на который передается сигнал. Нарушение такого взаимодействия лишает смысла активацию *c-H-ras*-белка при связывании GTP, прерывает передачу сигнала.

Основные черты строения и механизма действия *ras* 21-белка, по всей видимости, типичны для других G-белков, во всяком случае для их G-доменов. В частности, близкую структуру имеет G-домен фактора элонгации EF-Tu.

12.2. ТРАНСДУЦИН

Трансдуцин — гораздо более сложный G-белок, участвующий в передаче светового сигнала и, что чрезвычайно важно, в его огромном усилении. Схема его действия представляется следующим образом (рис. 12.3). Молекула *родопсина*, улавливая фотон, переходит в активированное состояние и образует комплекс с трансдуцином, G-белком, содержащим связанную молекулу GDP. Образование комплекса *активированный родопсин — трансдуцин* ускоряет обмен связанного с последним GDP на GTP. Образующийся в результате такого обмена комплекс *активированный родопсин — трансдуцин — GTP* распадается с отщеплением активированного родопсина, который может взаимодействовать с другой молекулой трансдуцина и также перевести ее в активное состояние за счет обмена GDP на GTP. Таким образом реализуется первая ступень усиления сигнала — активированная молекула родопсина за время своего существования успевает взаимодействовать с несколькими сотнями

молекул трансдуцина, переводя их в активную форму — комплекс трансдуцин — GTP.

Высвобождающийся после отщепления родопсина трансдуцин, активированный GTP, образует комплекс с неактивной формой фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата cGMP, в результате чего этот фермент активируется и начинает эффективно гидролизовать cGMP. Действие ферментного комплекса фосфодиэстераза — трансдуцин — GTP продолжается до тех пор, пока не произойдет гидролиз связанного GTP, катализируемый самим трансдуцином. После этого отщепляется и утрачивает активность фосфодиэстераза, прекращается накопление GMP, а комплекс трансдуцин — GDP оказывается готовым к новому циклу усиления светового сигнала за счет связывания с активированным светом родопсином.

Изложенная выше схема действия трансдуцина упрощена. В действительности трансдуцин представляет собой белок, построенный из трех неодинаковых субъединиц. Одна из них — $T\alpha$ (39 кДа) — связывает GTP и GDP и катализирует гидролиз GTP. Она содержит структуру, гомологичную белку c-H-ras. Другая субъединица трансдуцина — $T\beta$ (35 кДа) — очень близка субъединицам G_i и G_s белков аденилатциклатной системы (см. ниже) и представляет собой полипептидную цепь, построенную

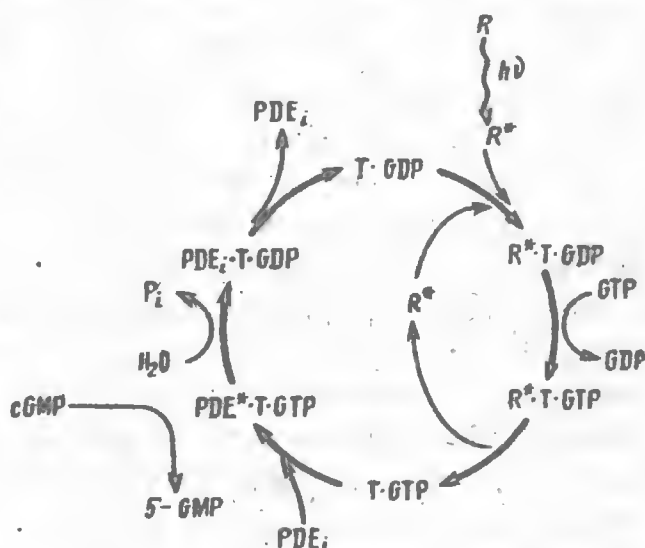


Рис. 12.3. Цикл усиления светового сигнала с участием G-белка трансдуцина

При поглощении кванта света родопсин R переходит в активированное состояние R^* и присоединяется к комплексу трансдуцин·GDP ($T \cdot \text{GDP}$). В тройном комплексе $R^* \cdot T \cdot \text{GDP}$ гуанозиндифосфат быстро обменивается на GTP, после чего родопсин, выполнив свою функцию, но оставаясь активированным, вновь может образовывать комплекс с другой молекулой трансдуцина, что усиливает сигнал примерно в пять раз. Трансдуцин, изменив свою конформацию за счет образования комплекса с GTP, приобретает способность взаимодействовать с неактивной формой фосфодиэстеразы (PDE_i). В результате последняя активируется (PDE^*) и тройной комплекс трансдуцин·GTP·активированная фосфодиэстераза ($T \cdot \text{GTP} \cdot \text{PDE}^*$) действует как эффективный катализатор гидролиза циклического GMP до тех пор, пока в нем не произойдет внутримолекулярный гидролиз GTP. За это время он успевает в среднем гидролизовать около 1000 молекул cGMP. После гидролиза GTP трансдуцин утрачивает способность связывать и активировать фосфодиэстеразу. Последняя переходит в неактивное состояние, а комплекс $T \cdot \text{GDP}$ возвращается в цикл.

из четырех тандемно повторяющихся участков сходной первичной структуры, длиной около 86 аминокислотных остатков каждый. Эта субъединица прочно связана с третьей — γ -субъединицей (8 кДа). Образование комплекса $\alpha\beta\gamma$ трансдукция с активированным родопсином ускоряет обмен GDP на GTP и приводит к отщеплению β - и γ -субъединиц, после чего освободившийся комплекс $T\alpha$ -GTP активирует фосфодиэстеразу cGMP.

Действие этой системы, состоящей из трех белков с регулируемой активностью, приводит к тому, что поглощение молекулой родопсина единственного фотона влечет за собой расщепление примерно 500 000 молекул циклического гуанозинмонофосфата, т.е. коэффициент усиления при передаче сигнала этой системой составляет $5 \cdot 10^5$. Существенно и то, что включение в систему G-белка трансдукция обеспечивает не только усиление сигнала, но и регулирование его длительности.

12.3. СТИМУЛИРУЮЩИЙ БЕЛОК G_s И ИНГИБИРУЮЩИЙ БЕЛОК G_i АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ

Как известно, аденилатциклаза, катализирующая образование циклического аденозинмонофосфата из АТР, определяет внутриклеточный уровень cAMP — вторичного мессенджера, который, в свою очередь, регулирует целый ряд биохимических процессов. Активность этого весьма важного для физиологии клетки фермента зависит от внеклеточных факторов, в частности адреналина, взаимодействующего со специфическим рецептором в клеточной мембране. Сигнал от рецептора к собственно аденилатциклазе передается *стимулирующим белком* G_s . Последний является гетеротримером и состоит из трех различных субъединиц. Субъединица $G_s\alpha$ с молекулярной массой 45 или 52 кДа у животных является продуктом экспрессии одного и того же гена. Различие в длине ее пептидной цепи вызвано *альтернативным сплайсингом*, который не одинаково протекает в различных клетках. Эта субъединица связывает GDP или GTP и катализирует гидролиз последнего. Комплекс $G_s - GTP$ растворим в воде и способен активировать аденилатциклазу без участия других субъединиц.

Способ действия G_s -белка представляется следующим. Комплекс $G_s\alpha$ -субъединицы и GDP вступает во взаимодействие с комплексом β - и γ -субъединиц, образуя неактивную форму белка — α -GDP- $\beta\gamma$. Замещение GDP на GTP в таком комплексе идет медленно, однако оно резко ускоряется при взаимодействии G_s -белка со стимулирующим рецептором, находящимся в мембране. В результате замещения GDP на GTP построенная из трех субъединиц структура распадается, отщепляя комплекс

β — γ , в котором γ -субъединица, видимо, играет роль якоря, позволяющего белку присоединиться к мембране.

Высвободившаяся α -субъединица, содержащая связанный GTP, представляет собой собственно активную форму белка. Она образует комплекс с аденилатциклазой, активируя этот фермент. Результатом является возрастание концентрации cAMP внутри клетки в ответ на относительно слабый внеклеточный сигнал, например присоединение гормона к рецептору. Продолжительность действия этого сигнала задается временем, которое необходимо для внутримолекулярного гидролиза α -субъединицей связанного GTP до GDP, после чего комплекс G_s - α -GDP вновь соединяется с β — γ -комплексом и белок возвращается в неактивное состояние.

Такая схема подтверждается тем, что негидролизующиеся аналоги GTP, связываясь с α -субъединицей, постоянно поддерживают аденилатциклазу в активированном состоянии. G_s - α -Субъединица может подвергаться ADP-рибозилированию, которое катализируется холерным токсином и состоит в модификации одного из остатков аргинина (Arg-207). Это вызывает снижение GTP-азной активности белка, что влечет за собой постоянную активацию аденилатциклазы и нарушение регуляции метаболических процессов.

Клеточные мембраны содержат и такие рецепторы, которые в ответ на связывание внешних эффекторов посылают сигналы, не активирующие, а, наоборот, ингибирующие аденилатциклазу. Действие таких рецепторов опосредовано особым "ингибирующим" G_i -белком и протекает, видимо, следующим образом. После связывания эффектора рецептор взаимодействует с G_i -белком, образованным тремя субъединицами: α , β , γ . Как и в рассмотренном выше случае, это приводит к диссоциации белка на α -субъединицу, сохраняющую связь с рецептором до тех пор, пока не пройдет внутримолекулярный гидролиз GTP, и β — γ -комплекс. Последний построен из β -субъединицы, такой же, как и в активирующем G_s -белке, и γ -субъединицы, которая точно так же играет роль мембранного якоря. β — γ -Комплекс связывает α -субъединицу стимулирующего белка αG_s в тройной неактивный комплекс αG_s — GDP- β — γ , не позволяя ей активировать аденилатциклазу. Таким образом, ингибирующий G_i -белок действует, высвобождая в ответ на связывание эффектора ингибитор активирующего G_s -белка — комплекс β — γ . Время, в течение которого этот комплекс свободен от контакта с α -субъединицей, зависит от того, насколько быстро последняя расщепит связанный GTP.

В заключение отметим распространенность G-белков как передатчиков сигналов со своего рода встроенным таймером. Обнаружено около 150 генов таких белков. Для многих из них функция пока неизвестна,

не установлено даже, принадлежат ли они к стимулирующему G_{α} - или ингибирующему G_{β} -типу; соответственно их относят к G_0 -белкам. В то же время возрастает число G-белков, участвующих в усилении слабых внешних сигналов. Например, найден G-белок, вовлеченный в восприятие запахов.

G-белками являются многие белковые факторы трансляции. Как уже упоминалось, фактор EF-Tu, состоящий из 393 аминокислотных остатков, содержит G-домен (остатки 1—199). При образовании этим белком комплекса с фактором EF-Ts последний как бы раскрывает молекулу EF-Tu и "вставляет" в нее GTP, выталкивая GDP. Вызванные этим конформационные изменения G-домена (остатки 1—199) передаются двум другим доменам, взаимодействующим с аминоацил-тРНК и рибосомой. После образования комплекса EF-Tu-GTP-рибосома-аминоацил-тРНК ускоряется гидролиз GTP в каталитическом центре G-домена. Очевидно, что GTP-разная активность G-домена в значительной мере зависит от того, изолирован ли EF-Tu-фактор или находится в комплексе с рибосомой и аминоацил-тРНК. Иными словами, существует многосторонняя связь между тонкой структурой каталитического центра G-домена и лигандсвязывающими участками поверхности EF-Tu-белка, которая реализуется, по-видимому, за счет относительно небольших, но функционально важных конформационных изменений.

После гидролиза GTP до GDP связь EF-Tu-фактора с рибосомой и аминоацил-тРНК резко ослабевает. Если по каким-либо причинам гидролиз GTP произойдет слишком быстро, EF-Tu-фактор не успеет выполнить свою роль организатора комплекса аминоацил-тРНК с рибосомой, что приведет к понижению точности трансляции.

Таким образом, G-белки представляют собой эффективные регуляторы, способные усиливать внешний сигнал и определять длительность его действия. Они используют для этого весьма чувствительные конформационные изменения, сопровождающие связывание GTP или GDP, а также способность к внутримолекулярному гидролизу GTP, причем все эти факторы могут существенным образом изменяться при образовании комплексов G-белков с другими белками.

ГЛАВА 13 ИММУНОГЛОБУЛИНЫ

Иммуноглобулины — белки, синтезируемые в организме позвоночных и способные распознавать и специфически связывать чужеродные молекулы — *антигены*, а также включать механизм их эли-

минирования (удаления), выполняя тем самым защитную функцию *антител*. Заметим, что белки, обладающие свойством избирательно связывать другие молекулы, не редки. Более того, хорошо известны случаи образования белками чрезвычайно прочных комплексов с различными соединениями — *лигандами*. К ним относятся, например, комплексы авидина или его микробного аналога — стрептавидина — с биотином, комплексы ферментов и их природных ингибиторов и т.п. Таким образом, само по себе связывание макромолекул или других лигандов не представляет собой уникального свойства иммуноглобулинов.

Необычна способность этого семейства белков, обладающих целым рядом общих, постоянных для него структурных черт, *создавать огромное многообразие центров связывания*, комплементарных множеству антигенов, совершенно различных химически. Сразу же заметим, что речь не идет о создании той или иной особой антитела, комплементарного данному антигену. Возникновение такой структуры есть результат более или менее длительного эволюционного процесса, на уровне организма происходит лишь отбор клеток, несущих предсуществующую генетическую информацию о ней, и, возможно, некоторая ее модификация. Важно, что такая структура практически *всегда может быть найдена*. Следовательно, при описании семейства иммуноглобулинов необходимо в первую очередь выяснить структурные предпосылки, которые обеспечивают решение этой функциональной задачи.

13.1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНА G

Среди известных типов иммуноглобулинов иммуноглобулин G обладает наиболее простой структурой и особенно хорошо изучен. Его молекула имеет четвертичную структуру и образована двумя тяжелыми (H) и двумя легкими (L) цепями (субъединицами), что отражает формула H_2L_2 . Целостность четвертичной структуры поддерживается как нековалентными взаимодействиями, так и межсубъединичными дисульфидными связями (рис. 13.1).

В пространственной структуре и легкой, и тяжелой цепей иммуноглобулинов четко прослеживаются домены, отвечающие отрезкам последовательности, которые содержат примерно 110 аминокислотных остатков. Домены сходны по способу укладки полипептидной цепи и могут быть отнесены к типичным β -структурным белкам. Так, в C_L -домене четыре антипараллельных отрезка пептидной цепи образуют

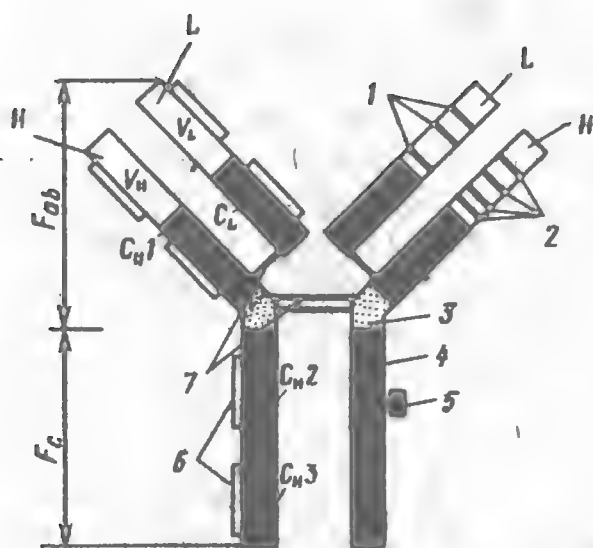


Рис. 13.1. Строение молекулы иммуноглобулина G:

H — тяжелая цепь, L — легкая цепь, C_L и C_H — константные области, L_L и L_H — вариабельные области; 1 — гипервариабельные участки легкой цепи, 2 — гипервариабельные участки тяжелой цепи, 3 — шарнирная область, 4 — участок связывания комплемента, 5 — углевод, 6 — внутрицепевые дисульфидные связи, 7 — межцепевые дисульфидные связи; Fab — фрагмент, связывающий антиген, Fc — кристаллизующийся фрагмент.

Легкие цепи иммуноглобулина G состоят из двух таких доменов, тяжелые — из четырех (рис. 13.2).

Если сравнивать первичные структуры полипептидных цепей целого ряда индивидуальных иммуноглобулинов (*моноклональных антител*), то оказывается, что в аминоконцевых доменах как легких, так и тяжелых цепей наблюдается очень высокий процент аминокислотных замен. Соответствующие фрагменты полипептидной цепи получили название *вариабельных* и обозначаются V_L (вариабельный домен легкой цепи) и V_H (вариабельный домен тяжелой цепи).

Остальные домены, в которых аминокислотные замены встречаются редко, называют *константными* и обозначают C_L — константный район легкой цепи, C_H1 , C_H2 , C_H3 — константные домены тяжелой цепи, номера которых возрастают к карбоксильному концу полипептида.

Четко выраженная доменная организация молекулы иммуноглобу-

один β -складчатый слой, еще три отрезка — другой, примерно параллельный первому. Между этими слоями, в формировании которых участвует примерно 60% аминокислотных остатков, расположено гидрофобное ядро, в которое включена и дисульфидная связь, соединяющая эти два β -слоя, будучи примерно перпендикулярна им.

Третичная структура других доменов аналогична, отличаюсь лишь деталями. В целом же сходство их строения настолько значительно, что домены иммуноглобулинов принято рассматривать как потомки небольшого прародительского белка, который в ходе эволюции был включен в качестве нескольких повторов в гораздо более протяженные и функционально специализи-

лина делает возможным самостоятельное существование, а в ряде случаев и функционирование отдельных ее частей при условии, что в них сохраняются более или менее сложные ансамбли доменов. Так, давно известны аномальные белки Бенс-Джонса, которые представляют собой димеры L-цепей.

Домены иммуноглобулинов, соответственно расположенные в разных цепях, взаимодействуют между собой, как правило, за счет нековалентных связей, что приводит к промежуточным подуровням структурной организации. Например, переменные домены V_L и V_H взаимодействуют весьма тесно, образуя единый центр связывания антигена. Такой "сдвоенный" домен (иногда называемый *Fv-модулем*) обладает определенной подвижностью как целое относительно следующего модуля — сдвоенного домена $C_L + C_H1$. Более того, два таких сдвоенных домена (модуля) — $V_L + V_H$ и $C_L + C_H1$ — объединяются в общую структуру: Fab'-фрагмент (от англ. *Fragment antibody-binding* — антиген-связывающий фрагмент).

Этот фрагмент может быть отщеплен при помощи ограниченного протеолиза от остальной части молекулы — Fc-фрагмента (от англ. *crystallizable* — кристаллизующийся), в который входят две C-концевые половины тяжелых цепей, образованные доменами C_H2 и C_H3 . Fc-фрагмент не участвует непосредственно в связывании антигена, однако ответствен за взаимодействие со специфическими рецепторами иммуноглобулинов на поверхности клеток и необходим для инициирования целого каскада реакций, направленных на элиминирование связанного антителом антигена.

Существенно, что Fab'-фрагмент не только устойчиво удерживает

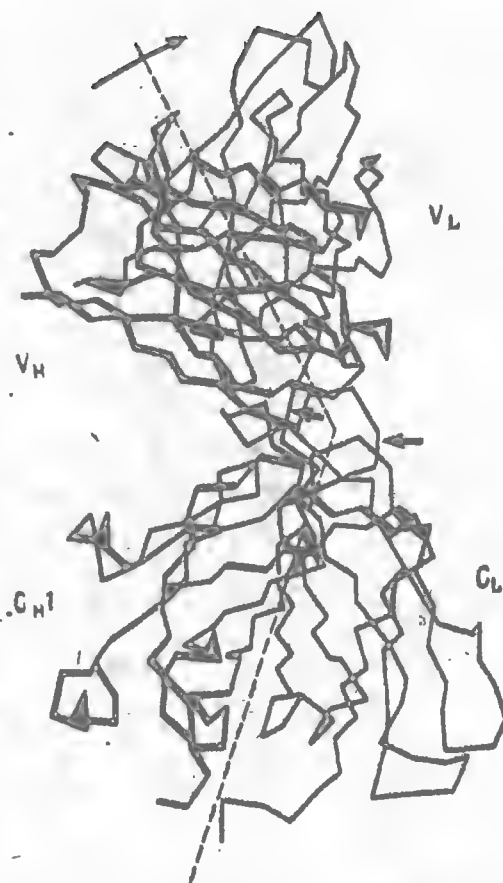


Рис. 13.2. Домены в Fab'-фрагменте иммуноглобулина G

Вариабельные домены легкой (V_L) и тяжелой (V_H) цепей объединяются в домен, непосредственно взаимодействующий с антигеном. Константные участки (C_H1 и C_L) этих цепей также образуют домен. Стрелками показаны участки цепей, протеолиз которых приводит к разделению доменов

свою пространственную структуру и может существовать как независимая молекула, но достаточно автономен и функционально, в полной мере сохраняя способность связывать молекулу антигена. Fab'-фрагменты в составе целой молекулы иммуноглобулина G способны двигаться как целое относительно Fc-фрагмента, что придает иммуноглобулину так называемую *сегментную гибкость*. Это позволяет каждому из двух центров связывания, локализованных в аминоконцевой части Fab'-фрагментов, реагировать с соседними антигенными участками в протяженной структуре, например в бактериальной стенке. Угол между осями Fab'-фрагментов в целых молекулах иммуноглобулина может существенно меняться, приближаясь даже к 180° . Гибкость обеспечивается и специфическими особенностями первичной структуры расположенного на стыке C_H1 и C_H2 доменов *шарнирного участка*, богатого остатками пролина (на примере иммуноглобулина γ -G1 Daw):



Ограниченный протеолиз в этом случае легко осуществим, так как доменная структура продуктов расщепления достаточно устойчива и способна противостоять глубокому гидролизу протеиназой. В результате действие последней ограничивается *междоменным шарнирным участком* пептидной цепи. При этом в зависимости от условий, в частности от специфичности протеолитического фермента, гидролиз проходит то "слева", то "справа" от межсубъединичных дисульфидных связей, что приводит в первом случае к Fab'-фрагментам, во втором — к их димерам — (Fab)₂-фрагментам. К получению Fab'- и (Fab)₂-фрагментов прибегают при производстве антитоксических сывороток. Интересно, что специфический протеолиз шарнирного участка используется патогенными микроорганизмами для инактивации иммуноглобулина A, содержащегося в секрете слизистых оболочек.

Итак, существование в иммуноглобулине нескольких подуровней структурной организации за счет взаимодействия доменов, располо-

женных в разных цепях этого белка, является необходимой предпосылкой его функционирования. Эта особенность строения иммуноглобулина не объясняет, однако, возможности образования в рамках семейства структурно весьма близких белков огромного множества антител, способных специфически связывать различные антигены.

13.2. ЦЕНТР СВЯЗЫВАНИЯ АНТИГЕНОВ

Как упоминалось, центр связывания антигенов формируют совместно *вариабельные домены легкой и тяжелой цепей*: V_L и V_H . По способу пространственной укладки пептидных цепей они похожи, образуя, как и другие домены иммуноглобулинов, два β -складчатых слоя, которые отстоят один от другого примерно на 10 Å и соединены внутридоменной дисульфидной связью. Пространство между слоями заполнено достаточно плотно упакованными гидрофобными боковыми цепями аминокислот. Все эти устойчивые черты третичной структуры V_L - и V_H -доменов предопределены сходством их первичной структуры.

Однако петли, соединяющие отрезки β -структуры в каждом из этих доменов, резко отличаются по последовательности аминокислот, если сравнивать между собой однотипные антитела с разной специфичностью — они *гипервариабельны* (рис. 13.3, 13.4).

Три гипервариабельные петли каждого из доменов пространственно сближены и объединяются в единую весьма неровную поверхность — *зону связывания антигена*. Последняя образована шестью петлями: L1, L2, L3 (из V_L -домена) и

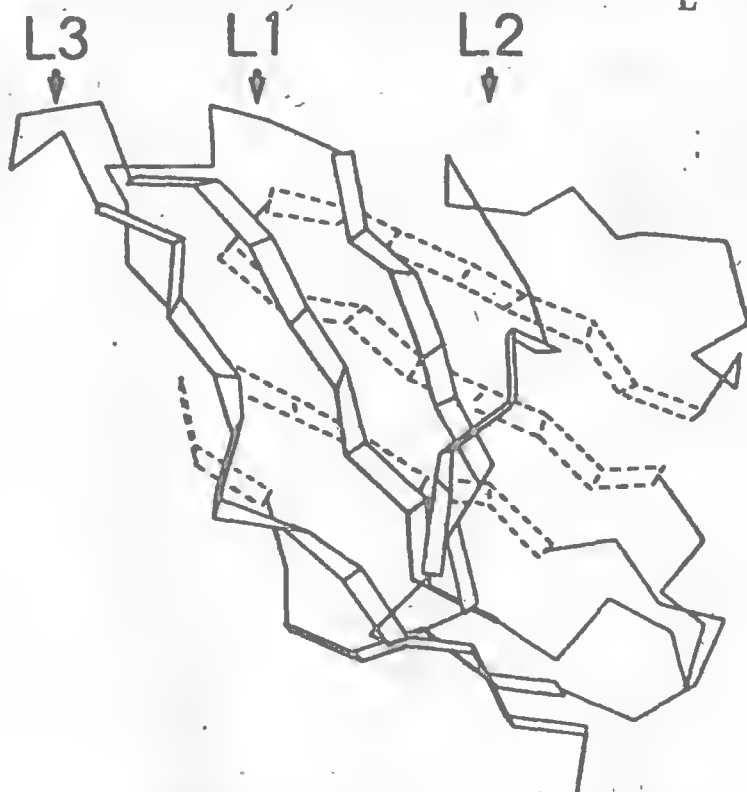


Рис. 13.3. Пространственное строение *вариабельного домена легкой цепи* одного из иммуноглобулинов

Складчатыми полосками изображены β -структурные отрезки; L1, L2, L3 — гипервариабельные петли, соединяющие эти отрезки (соответствуют районам, определяющим комплементарность, — CDR)

H1, H2 и H3 (из V_H -домена). Эти петли почти точно совпадают с гипервариабельными участками аминокислотной последовательности V -доменов, так называемыми *районами, определяющими комплементарность* (от англ. Complementarity Determining Regions, сокращенно CDR).

Замены аминокислот в этих петлях (рис. 13.5) приводят к замещению одних боковых цепей другими и, следовательно, к изменению рельефа и всего характера антигенсвязывающей зоны, чем и определяется ее способность быть комплементарной молекулам самой различной природы. Поверхность антигенсвязывающего района изменяется еще и потому, что замены аминокислот в гипервариабельных участках влияют на конформацию образуемых ими петель. Может изменяться и длина петель, в особенности петли H3.

Рентгеноструктурный анализ комплексов антиген — антитело (по техническим причинам обычно исследуют комплекс, образованный Fab-фрагментом, а не целой молекулой иммуноглобулина) позволил вскрыть основные факторы, которыми определяются прочность и высокая специфичность их образования.

Прежде всего это плотная подгонка поверхности активного центра антитела к структуре антигена. Макромолекулы, в особенности белки, вступают в реакцию с данным иммуноглобулином лишь частью своей поверхности — так называемым *эпитопом*. Для комплексов лизоцима с

индивидуальными иммуноглобулинами (моноклональными антителами) показано, что их контактирующие поверхности подогнаны настолько точно, что на площади примерно в $700 \text{ \AA}^2$ оказываются вытесненными все молекулы воды, которые гидратировали оба белка.

Это удаление связанной, а значит, упорядоченной воды повышает неупорядоченность системы в целом, что приводит к росту энтропии и благоприятствует образованию прочного комплекса. Вместе с

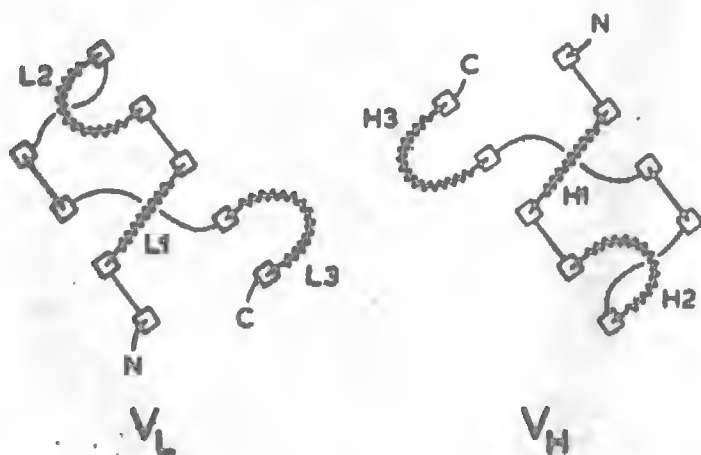


Рис. 13.4. Расположение гипервариабельных участков в антигенсвязывающей зоне иммуноглобулина

Квадратами обозначены β -спиральные отрезки, рассматриваемые с торца, зигзагообразными линиями — гипервариабельные петли. Остальные обозначения общепринятые; ср. рис. 13.5

Ser-91 (Главная цепь)	Tyr-20
Asp-92 (H-связь, главная цепь)	Tyr-20, Arg-21
Tyr-96 (H-связь)	Arg-21
<i>Домен V_H</i>	
Thr-30	Arg-70
Ser-31 (H-связь)	Arg-73, Leu-75
Asp-32 (Ионная связь)	Lys-97
Tyr-33 (H-связь)	Trp-63, Lys-97, Ile-98, Ser-100, Asp-101
Tyr-50 (H-связь)	Arg-21, Ser-100
Ser-52 (H-связь)	Asp-101
Tyr-53 (H-связь)	Trp-63, Leu-75, Asp-101
Ser-54	Asp-101
Ser-56	Asp-101, Gly-102
Tyr-58 (H-связь)	Arg-21, Ser-100, Gly-102
Trp-95	Arg-21, Lys-97, Ser-100

Полное вытеснение воды из зоны связывания антигена стабилизирует водородные и ионные связи. Результатом является весьма высокая прочность комплекса, характеризующаяся константой связывания порядка 10^7 — 10^{10} М⁻¹.

Заметим, что рельеф поверхности контакта антигена и антитела может быть весьма различным. Поверхность бывает почти плоской, со впадинами или выпуклостями. Например, одно из антител к лизоциму частично заполняет своим выпуклым центром связывания впадину, в которой размещается субстрат этого фермента, и поэтому является его ингибитором. У лизоцима в этом комплексе площадь контакта с иммуноглобулином составляет около 15% всей доступной растворителю поверхности белка.

В качестве эпитопа нередко выступает несколько сближенных в пространственной структуре белка-антигена участков последовательности. Определена структура трех комплексов лизоцима с моноклональными антителами. Суммарная площадь эпитопов в них — около 40% поверхности белка, а поскольку известно, что существуют и другие эпитопы, по-видимому, практически все или почти все доступные участки молекулы белка могут обладать иммунологической активностью.

Еще один источник способности семейства иммуноглобулинов связывать антигены самой различной структуры состоит в том, что поверхность зоны связывания, образованная V_L- и V_H-доменами составляет около 2000 Å² и намного превышает обычную площадь эпитопа на поверхности белка-антигена (500—1000 Å², у большинства небелковых

антигенов она еще меньше). Вследствие этого для образования комплементарной эпитопу структуры может использоваться не вся поверхность зоны связывания доменов V_L и V_H , а какая-то ее часть, в наибольшей мере соответствующая строению антигена.

13.3. МНОГООБРАЗИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Своеобразна организация структурных генов иммуноглобулинов, которая призвана обеспечить возможность образования очень большого числа антител. Гены, кодирующие легкие и тяжелые цепи, собираются из меньших по размеру генов, одни из которых, особенно многочисленные, кодируют переменные домены V_L и V_H (V-гены), а другие, которых гораздо меньше, — константные части молекулы (C-гены).

Так, константные домены легких цепей кодируются несколькими генами, что приводит к синтезу двух типов легких цепей: κ и λ . В гаплоидном геноме человека имеется один ген κ -цепи и несколько — λ -цепи. Число генов, которыми кодируются переменные домены, гораздо больше. Так, существует около 100 генов V_{κ} , на которых записаны аминокислотные последовательности переменных доменов легких цепей типа κ .

Заметим, что небольшой участок L-цепи, расположенный непосредственно перед константным районом — J (от англ. joining — соединяющий), кодируется особо и так же переменен. При созревании В-лимфоцитов из этих отрезков собираются гены L-цепей, в которых путем рекомбинации объединяются гены V_L —J— C_L , что приводит к возможности образования весьма многообразных легких κ -цепей.

Аналогично, из генов V_H (которых около 100) путем их рекомбинации с генами D_H , J_H и C_H образуются гены тяжелых цепей — V_H — D_H — J_H — C_H . Общее число вариантов зон связывания при этом составит около 10 млн. Эта величина еще более возрастет, если учесть вклад соматических мутаций, которые приводят к дополнительным заменам аминокислотных остатков в переменных доменах иммуноглобулинов.

Своеобразный механизм формирования генов иммуноглобулинов обеспечивает возникновение очень большого числа аминокислотных последовательностей, а доменная организация этих белков и концентрирование замен в немногих гипервариабельных отрезках цепи позволяет создавать в зоне связывания антител чрезвычайно разнообразные по рельефу и распределению функциональных групп поверхности,

среди которых всегда можно найти такую, которая комплементарна поверхности того или иного антигена.

Помимо рассмотренных выше иммуноглобулинов G существуют иммуноглобулины еще четырех классов: M, A, E и D. Их молекулы также построены из доменов и организованы по такому же принципу. В иммуноглобулинах M и E тяжелые цепи дополнены еще одним доменом — соответственно $C_{\mu}4$ и $C_{\epsilon}4$, в иммуноглобулинах A и M C-концевые районы тяжелых цепей соединены между собой с участием специальной J-цепи. Есть и другие отличия в их структуре, в частности содержание и распределение углеводных цепей. Иммуноглобулин M образует пентамеры $(L_2H_2)_5$. Мембранно-связанные иммуноглобулины, которые принадлежат классам M и D, содержат на C-концах тяжелых цепей небольшие домены, образованные преимущественно гидрофобными аминокислотами, которые выполняют роль якоря, удерживающего молекулу иммуноглобулина на наружной поверхности мембраны.

Таким образом, доменный принцип организации структуры и функции иммуноглобулинов чрезвычайно плодотворен и позволяет, используя один и тот же структурный мотив, создать богатую палитру антигенсвязывающих белков. Видимо, по такому же плану построены и некоторые рецепторы клеточных мембран.

ГЛАВА 14 ФИБРИЛЛЯРНЫЕ БЕЛКИ

Фибриллярные белки выполняют по преимуществу структурные функции, однако их роль ничуть не менее значительна, чем роль глобулярных белков, велико и число фибриллярных белков, особенно возросшее с открытием белков цитоскелета и межклеточного матрикса. Далее будут рассмотрены лишь некоторые, наиболее изученные фибриллярные белки.

14.1. КОЛЛАГЕН

Коллаген ("образующий клей") является, видимо, наиболее распространенным белком многоклеточных. Так, у млекопитающих он составляет по массе около $1/4$ суммарного белка. Коллаген — важнейший компонент соединительной ткани, он входит в структуру кожи, костей, сухожилий, кровеносных сосудов, хрящей, зубов. Его главная функция — образование нерастворимых фибрилл высокой прочности.

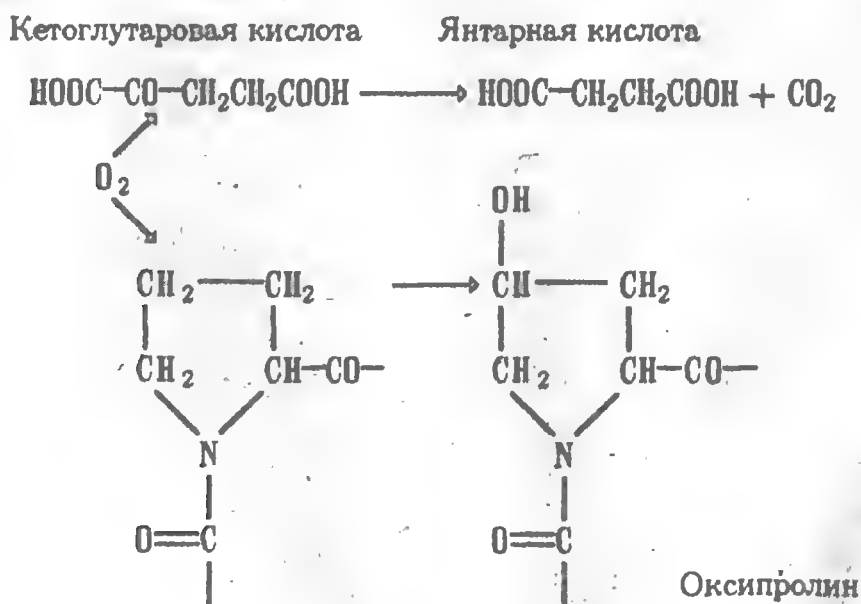
Существует не менее десяти структурных генов, которые кодируют различные молекулярные формы коллагена, отличающиеся первичной

структурой, а иногда и пространственным строением. Кодированные ими коллагены по-разному распределены в органах и тканях. Коллаген типа I, наиболее распространенный в организме и содержащийся в коже, сухожилиях, костях, роговице глаза, построен из двух полипептидных цепей: $\alpha 1$ и отличающейся первичной структурой цепи $\alpha 2$; коллагены других типов образованы тремя одинаковыми и характерными для данного типа полипептидными цепями. Каждая из полипептидных цепей коллагена образована примерно 1000 аминокислотных остатков. Для коллагена характерна интенсивная посттрансляционная модификация, глубина которой зависит от органа или ткани и изменяется с возрастом животного.

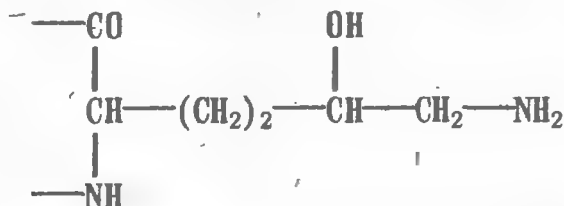
В первичной структуре полипептидных цепей, образующих фибриллы коллагенов I—IV, четко выражен повторяющийся на протяжении всей цепи структурный мотив: Gly—Xaa—Yaa (где Xaa и Yaa — различные аминокислоты), причем часто встречается структура Gly—Pro—Hyp. Этому соответствует высокое содержание глицина и пролина, а также оксипролина (Hyp).

Оксипролин, встречающийся только в коллагене и эластине, образуется как результат *контрансляционной модификации* пролина, которая происходит еще до завершения синтеза полипептидной цепи. Пролин, включенный в пептидную цепь, гидроксيليруется содержащим двухвалентное железо ферментом *пролилгидроксилазой*.

Фермент катализирует реакцию кислорода с пролином, при которой происходит гидрокселирование 4-го атома пролина, второй же атом молекулы кислорода реагирует с кетоглутаратом, превращая его в сукцинат и CO_2 . Двухвалентное состояние железа сохраняется в этих условиях благодаря восстановительному действию аскорбиновой кислоты:



Гидроксилированию по С-4 подвергаются только те остатки пролина, которые предшествуют остаткам глицина в последовательности Pro-Gly-Xaa-Yaa. Аналогичным образом (котрансляционно) *лизин-гидроксилаза* гидроксилирует по δ -углеродным атомам остатки лизина, предшествующие глицину. Гидроксильные группы *оксилизина*



служат точкой гликозилирования. К ним последовательно присоединяются галактоза и глюкоза. Отмеченные модификации происходят в фибробластах и открывают собой целую последовательность дальнейших превращений коллагена. Не претерпевший более глубоких модификаций "незрелый" коллаген называется *тропоколлагеном* и может быть выделен из кожи молодых животных.

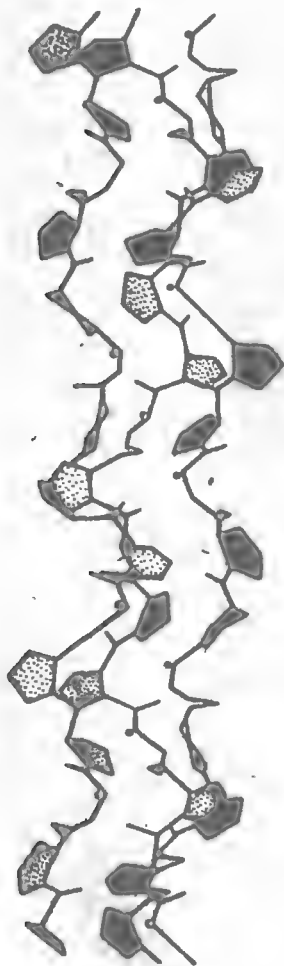


Рис. 14.1. Тройная спираль коллагена

Точками отмечены NH-группы остатков глицина, занимающих каждое третье положение

Тропоколлаген имеет форму стержня длиной 3000 Å и диаметром 15 Å и представляет собой три идущие в одном направлении полипептидные цепи, скрученные в спирали (рис. 14.1). Каждая из них аналогична спирали хорошо изученного модельного полипептида — поли-L-пролина. Последняя отличается от α -спирали уже тем, что в ней невозможна стабилизация водородными связями вдоль спирали, поскольку отсутствуют донорные группы NH. Вследствие этого конформация поли-L-пролина диктуется практически только пространственными ограничениями со стороны пирролидиновых колец остатков пролина. На один оборот спирали приходится точно три аминокислотных остатка. Далее три параллельно направленные спирали типа поли-L-пролина в коллагене закручиваются в пучок, образуя суперспираль.

Три спирали связаны между собой поперечными водородными связями. Роль глицина, обязательно занимающего каждое третье положение в пептидной цепи, состоит в том,

что он позволяет трем цепям коллагена сблизиться, так как не создает стерических помех в центре спирали, не имея боковой группы. Объемистые пирролидиновые кольца пролина и оксипролина направлены наружу (рис. 14.2).

Стабильность тройной спирали определяется кооперативными взаимодействиями, ее денатурация — переход в желатину — обычно происходит скачком в небольшом температурном интервале, середину которого принято называть *температурой плавления коллагена*. Интересно, что температура плавления коррелирует с содержанием суммы остатков пролина и оксипролина и как-то связана с температурой тела животного, превышая ее на несколько градусов.

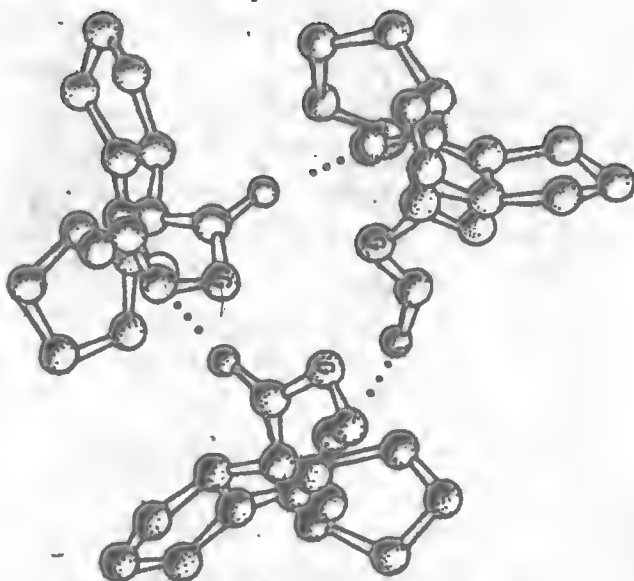


Рис. 14.2. Взаимодействие полипептидных цепей коллагена за счет образования водородных связей между остатками глицина (обозначены литерой G)

Необходимое для этого сближение цепей обеспечивается регулярно расположенными остатками глицина, не имеющими боковых цепей

	Сумма остатков про- лина и оксипролина	Температура плавления коллагена, °C	Температура тела животного, °C
Кожа теленка	232	39	37
> акулы	191	29	24-28
> трески	155	16	10-14

Такая "подогнанность" температуры плавления к температуре тела, видимо, обусловлена необходимостью обеспечить эластичность коллагеновых волокон. Гидроксирование пролина повышает стабильность и температуру плавления коллагена, поэтому нарушение гидроксирования, например при цинге за счет недостатка витамина С, приводит к поражению кожи, сосудов, выпадению зубов и т.п.

Образование тройной спирали коллагена может происходить спонтанно, однако это медленный процесс. *In vivo* такой скорости было бы недостаточно. Поэтому коллаген синтезируется в виде предшественни-

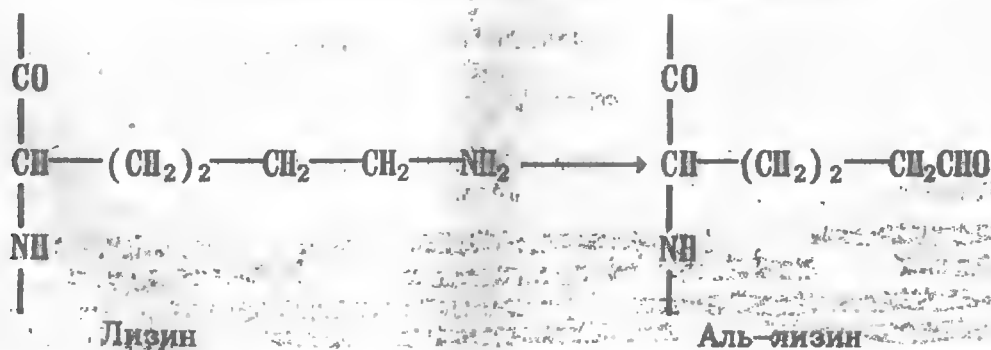
ка — проколлагена, который имеет молекулярную массу 140 кДа, в то время как молекулярная масса собственно α -цепи равна 95 кДа. В предшественнике N- и C-концевые участки трех полипептидных цепей, первичная структура которых лишена характерного "коллагенового" мотива, формируют глобулярные структуры, которые затем объединяются, взаимодействуя между собой, причем контакт между C-концевыми глобулами дополнительно стабилизируется межцепевыми дисульфидными связями.

В результате молекула проколлагена приобретает форму своеобразной гантели, в которой будущие коллагеновые пептидные цепи сближены и направлены параллельно, что резко упрощает и ускоряет свертывание тройной спирали. Таким образом, концевые глобулы выполняют функцию "монтажных устройств", облегчая правильную сборку молекулы проколлагена.

Проколлаген синтезируется и секретируется в межклеточное пространство фибробластами. Затем специфические проколлагенпептидазы отщепляют выполнившие свою роль глобулярные домены, оставляя тройную спираль, образованную полипептидными цепями, в каждой из которых структурный мотив Gly-Xaa-Yaa повторяется 338 раз (рис. 14.3).

Молекулы тропоколлагена упаковываются в коллагеновые волокна, располагаясь в них параллельно, однако со сдвигом по отношению друг к другу примерно на $1/4$ длины молекулы. Между концом одной молекулы и началом другой образуется просвет в 400 Å, который служит в костной ткани центром образования гидроксипатита.

Далее коллагеновое волокно стабилизируется целой системой поперечных сшивок. Среди процессов посттрансляционной модификации, определяющих созревание коллагена, особенно важно образование аль-лизина (альдегида-производного лизина) под действием лизиноксидазы:



Аналогичное превращение в альдегид претерпевает и оксилизин. Лизиноксидаза — медьсодержащий фермент, в котором в качестве

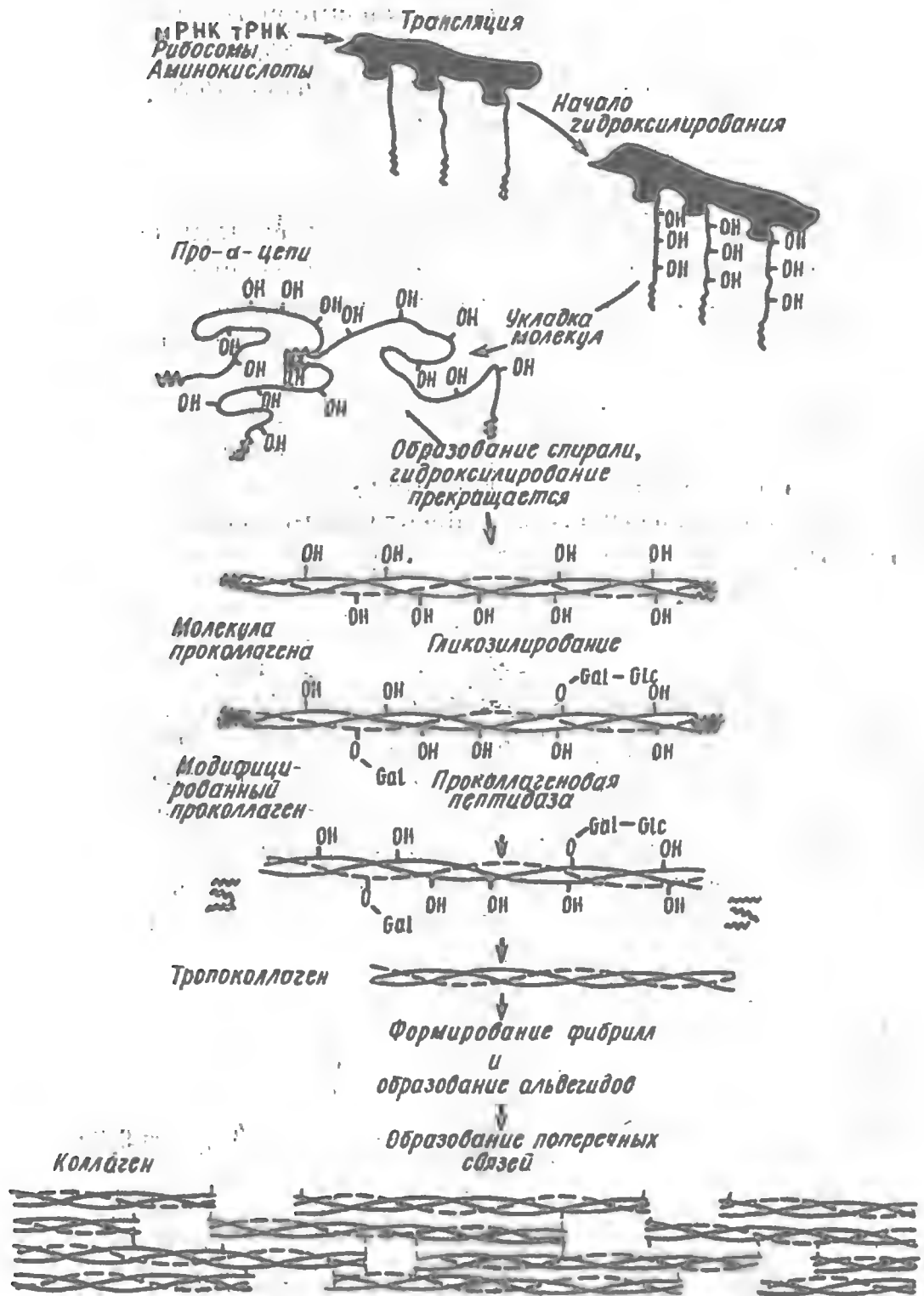
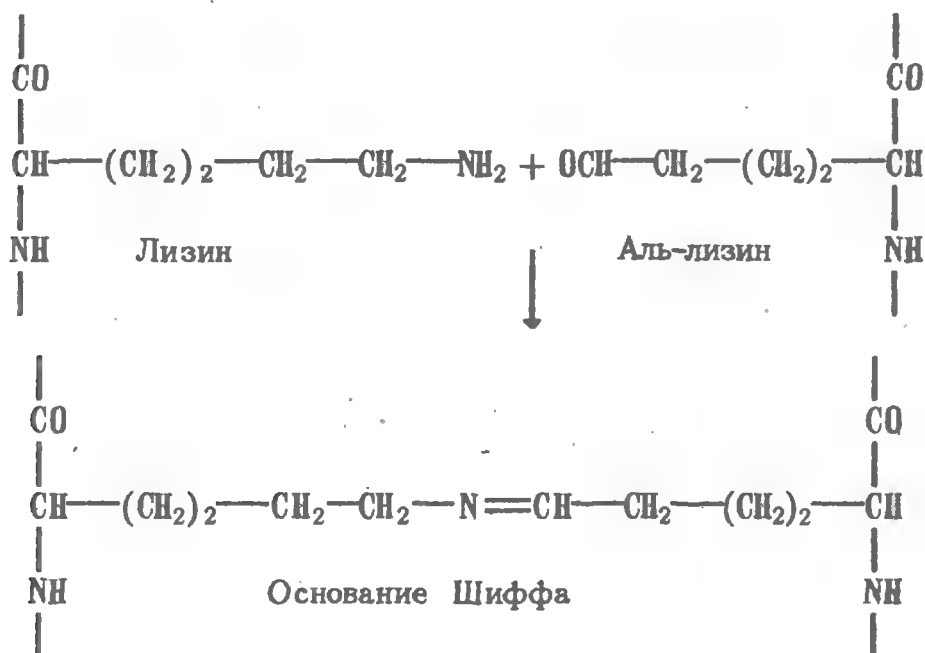
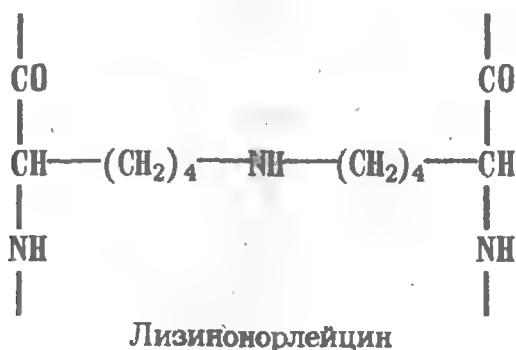


Рис. 14.3. Схема биосинтеза, сборки тройной спирали, формирования волокна и посттрансляционной модификации коллагена (остальные пояснения см. в тексте)

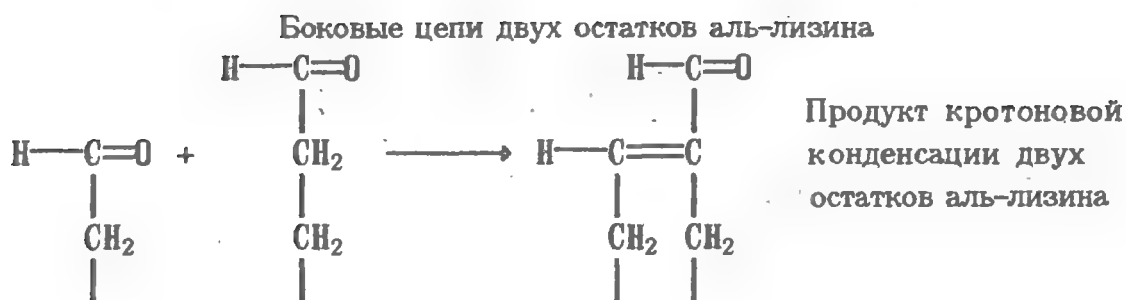
кофактора выступает пиридоксаль. Далее спонтанно, без участия ферментов, образуется шиффово основание с пространственно сближенной аминогруппой остатка лизина, находящегося в другой полипептидной цепи:



Связь —N=CH— , сама по себе малоустойчивая, восстанавливаясь до $\text{—NH—CH}_2\text{—}$, превращается в весьма прочную поперечную сшивку — так называемый лизинонорлейцин:



Альдегидные группировки аль-лизина, будучи весьма реакционно-способными, легко вступают в реакции альдольной, а затем и кротоновой конденсации. Далее возможно присоединение к активированной двойной связи имидазольной группы гистидина и еще более сложные превращения:



Количество и характер возникающих при этом поперечных связей позволяют регулировать эластичность волокна.

Таким образом, биосинтез коллагена включает целую цепь пост-трансляционных модификаций. В фибробластах синтезируется и собирается проколлаген, в котором уже проходит образование остатков оксипролина, оксилизина и гликозилирование последних. После секреции проколлаген подвергается ограниченному протеолизу, который приводит к отщеплению концевых глобулярных структур и образованию тропоколлагена. Далее происходит созревание этого еще сохраняющего водорастворимость белка и возникает более или менее разветвленная система поперечных межцепевых "сшивок". Интенсивность последнего процесса зависит от возраста животного и природы ткани, в которой локализован коллаген, что позволяет регулировать физические свойства структур, в которые он включен.

Биологическая значимость этой последовательности превращений подчеркивается тем, что нарушение хотя бы одного из ее звеньев приводит к серьезным нарушениям в формировании соединительной ткани. Например, блокирование лизиноксидазы биогенным амином — латерином $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ (β -аминопропионитрил), попадающим в организм животного при поедании им определенного вида горошка, делает

невозможным образование аль-лизина и тем самым прерывает дальнейшее формирование поперечных сшивок, стабилизирующих коллагеновые волокна, что приводит к глубоким поражениям кожи. Образование поперечных связей тормозится и при дефиците ионов меди, входящих в активный центр лизиноксидазы.

Интересно, что в стенках клеток растений содержатся оксипролин-богатые гликопротеины, играющие роль структурообразующих белков. Другой структурный компонент стенок растительных клеток — глицин-богатый белок, найденный в бобовых. В его аминокислотной последовательности на долю глицина приходится 60%. Предполагают, что этот белок образует β -структуру.

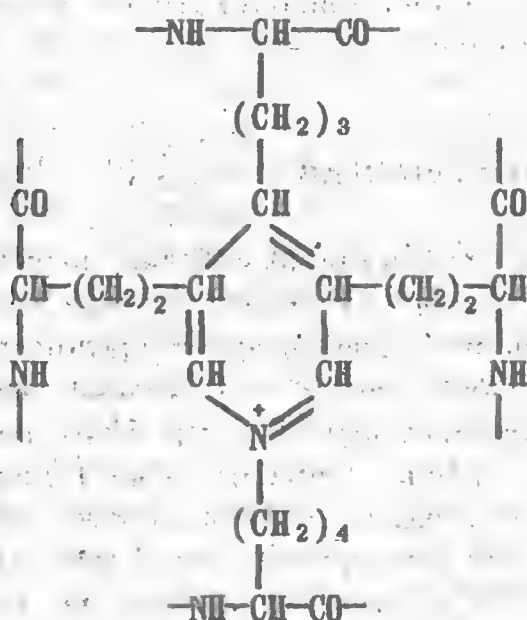
14.2. ЭЛАСТИН

Эластин — нерастворимый фибриллярный белок, играющий важную роль в формировании *эластичных тканей*, прежде всего стенок артерий, легких и связок. Полипептидная цепь его предшественника — тропозластина, — синтезируемая, как и коллаген, фибробластами, состоит примерно из 760 аминокислотных остатков. Более половины из них приходится на глицин и аланин, четверть — на типично гидрофобные аминокислоты, среди которых особенно много валина, в то время как число гидрофильных аминокислот очень невелико. Содержание пролина в эластине (11%) значительно меньше, чем в коллагене. Часть остатков пролина гидроксильрована, однако оксипролин, по-видимому, не играет существенной роли в эластине и, возможно, образуется попутно, как следствие высокой активности пролингидроксилазы в фибробластах, где синтезируется и коллаген.

Для первичной структуры эластина характерно обилие повторяющихся участков последовательности, например последовательность Pro-Gly-Val-Gly-Val встречается в эластине по меньшей мере 11 раз подряд. Эластин построен из большого числа чередующихся гидрофобных и гидрофильных участков полипептидной цепи, которые соответствуют множеству относительно коротких экзонов в структурном гене этого белка. Гидрофильные участки обогащены лизином.

По-видимому, гидрофобные участки ответственны за агрегацию, чрезвычайно характерную для эластина. Гидрофильные же определяют образование межмолекулярных сшивок, которые делают агрегацию необратимой. Примерно в середине каждого из гидрофильных участков содержатся остатки лизина, разделенные двумя-тремя остатками других аминокислот, часто аланина, например Lys-Ala-Ala-Lys, Lys-Ser-Ala-Ala-Lys-Val-Ala-Ala-Lys, Lys-Ala-Pro-Lys.

При созревании тропоэластина почти все остатки лизина превращаются в аль-лизин под действием того же медьсодержащего фермента лизиноксидазы, который модифицирует коллаген. Образовавшиеся при этом альдегидные группы вступают в реакции конденсации с другими остатками аль-лизина, а также с ϵ -аминогруппой еще не окисленного остатка лизина, в результате чего четыре сближенных в агрегате остатка лизина дают десмозин — аминокислоту с пиридиновым ядром, объединяющую в один узел четыре участка пептидной цепи эластина:



Десмозин объединяет в узел четыре остатка лизина

Сшивки такого типа делают эластин нерастворимым в воде, в то время как участки между ними, имеющие конформацию неупорядоченного клубка, сохраняют способность к обратимому растяжению, чем и обусловлена растяжимость связок и стенок артерий. Инактивация лизиноксидазы, которая может быть вызвана дефицитом ионов меди или блокированием пиридоксала в активном центре фермента (вследствие реакции с аминогруппой β -аминопропионитрила — латирина), тормозит созревание эластина и приводит к утрате эластичности связок и артерий, а иногда к разрыву аорты.

14.3. КЕРАТИНЫ

Кератин — структурообразующий фибриллярный белок, синтезируемый эпителиальными клетками и образующий в них так называемые промежуточные филаменты — тяжи, участвующие в построении цитоскелета. В цитоскелет клеток других типов входят белки, родственные кератину. Из кератина же построены роговые образования —

волосы, ногти, когти, клювы, перья, шипы, панцирь, сухой наружный слой кожи.

По мере перемещения эпителиальных клеток к поверхности синтез кератинов становится все более интенсивным и в конечном счете волокна кератина заполняют всю клетку, поверхностные структуры которой оттесняются на периферию волокна, образуя его оболочку — кутикулу.

В эпителиальных клетках не менее 20 структурных генов кодирует синтез кератинов, принадлежащих к одному из двух типов: I или II; кератины типа III синтезируются в качестве белков цитоскелета в неэпителиальных клетках. Все кератины, являясь эволюционно родственными белками, построены по одному плану. Так, эпидермальный кератин II человека содержит в одной полипептидной цепи 562 аминокислотных остатка, причем его N- и C-концевые фрагменты (своего рода домены), по-видимому, не имеют какой-либо доминирующей регулярной вторичной структуры, тогда как последовательность центральной части полипептидной цепи, которая соответствует четырем экзонам, состоит из состыкованных четырех α -спиральных доменов. В каждом из них многократно повторяется одинаковый структурный мотив из семи аминокислотных остатков, среди которых первый и

четвертый, как правило, гидрофобны. Например, с 386-го остатка начинается фрагмент (гидрофобные остатки выделены полужирным шрифтом):
Phe-Gln-Arg-Leu-Arg-Ser-Glu-Ile-Asp-His-
-Val-Lys-Lys-Gln-Cys-Ala-Asn-Leu и т.д.

Регулярное появление гидрофобных боковых цепей через каждые три или два аминокислотных остатка в α -спиральных участках кератина приводит к образованию своеобразных гидрофобных "гребней", взаимодействие между которыми стабилизирует *суперспираль*, так называемую *протофибриллу*, образующуюся при закручивании двух (рис. 14.4) одинаково направленных цепей кератина друг относительно друга. По-видимому, концевые неспиральные участки в полипептидных цепях кератина, как и в коллагене, выполняют "монтажную" функцию, способствуя их правильной укладке и ускоряя образование суперспирали. Одиннадцать протофибрилл, соединяясь в пучок, образуют *микрофибриллу*, микрофибриллы собираются в *фибриллы*.

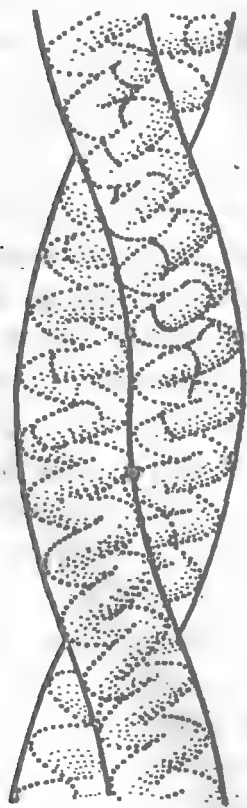


Рис. 14.4. Двойная спираль кератина

При образовании роговых структур — волос,

шерсти, панциря и т.п. — большую роль играет белок матрикса, в который погружены фибриллы кератина. Этот неспиральный белок в отличие от собственно кератина очень богат остатками цистеина, которые, окисляясь, образуют многочисленные дисульфидные мостики, упрочняющие структуру фибрилл кератина и делающие их практически нерастворимыми. Так, цистеин-богатые белки волос человека и шерсти овцы, очень похожие по первичной структуре, содержат в полипептидной цепи 168 аминокислотных остатков, из которых 36% приходится на цистеин, превращающийся при окислении в цистин. Характерна N-концевая последовательность богатого серой белка волос человека, в которой остатки цистеина занимают каждое третье или четвертое место:

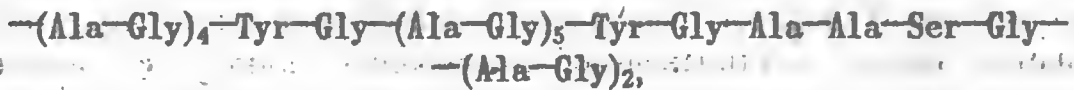
Met-Gly-Cys-Ser-Gly-Cys-Ser-Gly-Gly-Cys-Gly-Ser-Ser-Cys-Gly-
-Gly-Cys-Gly-Ser-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Ser-Ser-Ser-Cys-Cys-

Содержание остатков цистина в кератиновых роговых образованиях сильно зависит от вида животного, пищевого рациона, природы эпидермальных тканей. Так, содержание цистина в шерсти овцы значительно выше, чем в ее рогах. Оно достигает 20% в панцире черепахи.

Растягивание кератиновых волокон при одновременном их увлажнении приводит к глубокой реорганизации вторичной структуры: α -спиральные цепи, вытягиваясь, переходят в β -структуру с одновременным установлением системы межцепевых водородных связей, чему способствует и увлажнение. Такой переход и обусловленное им растяжение кератиновых волокон, например волос, обратимы — при снятии нагрузки и понижении влажности происходит переход в α -спиральную структуру и сокращение длины. Это свойство используют при устройстве психрометров — приборов, регистрирующих влажность воздуха.

Восстановление дисульфидных связей, проводимое обычно действием избытка меркаптосоединения (тиогликолевой кислоты или меркаптоэтанола), снимает поперечные сшивки в богатом цистином белке матрикса и делает волокна кератина весьма гибкими, поддающимися формованию. Последующее окисление вызывает образование уже иного набора дисульфидных связей и фиксирует новую форму волокна. Такую обработку применяют при "химической" завивке волос, а также для придания шерстяным тканям, построенным из кератина, несминаемых складок.

К β -структурным фибриллярным белкам относятся *фиброин шелка* и *белок паутины*. В фиброине шелка полипептидные цепи, богатые глицином и аланином, содержат протяженные повторяющиеся последовательности Ala-Gly, например



и образуют антипараллельную β -структуру. Боковые цепи остатков аланина, чередующихся в последовательности фиброина с глицином, располагаются по одну сторону β -складчатого листа, так что гидрофобные контакты между ними дополнительно стабилизируют структуру. Близкие к полностью вытянутым полипептидные цепи фиброина придают волокну прочность, однако эластичность его невелика и определяется по преимуществу менее регулярными участками структуры. В природной шелковой нити типично фибриллярный белок фиброин погружен в своего рода матрике, образованный другим, но менее упорядоченным структурно белком — *серицином*.

* * *

Завершая рассмотрение особенностей некоторых фибриллярных белков, отметим, что их первичная структура, как правило, содержит характерные "мотивы", т.е. повторяющиеся одинаковые или однотипные последовательности аминокислот, которые обеспечивают формирование весьма протяженной регулярной вторичной структуры.

Граница между глобулярными и фибриллярными белками не столь резка, как это может показаться. Нередко компактные глобулярные и вытянутые фибриллярные элементы совмещаются в рамках одной и той же структуры. Это свойственно предшественникам фибриллярных белков, например проколлагену, но встречается и в зрелых глобулярных белках, например в гемагглютинине вируса гриппа, ряде белков, регулирующих активность ДНК с участием "лейциновой молнии", и т.п.

Вместе с тем немалый интерес представляют белки, образованные очень длинными полипептидными цепями, которые, однако, в отличие от рассмотренных выше фибриллярных белков формируют пространственную структуру в виде длинной гирлянды обычно небольших, функционально специализированных глобул. В таких полидоменных белках

соотношение длины и сечения молекулы характерно для фибриллы, что отражается на их физико-химических свойствах, однако присутствуют и черты, свойственные типично глобулярным образованиям. Форма их гигантских макромолекул нередко далека от линейной фибриллы и подчас весьма сложна.

Такого рода белки играют важную роль в образовании внеклеточного матрикса соединительной ткани — специфической среды, в которую погружены клетки. Они участвуют в процессах эмбрионального развития тканей, внутритканевой подвижности клеток, их закреплении, наконец, в расселении опухолевых клеток — метастазировании.

14.5. ФИБРОНЕКТИН

Фибронектин — высокомолекулярный гликопротеин (молекулярная масса около 500 000 Да), образованный двумя почти идентичными субъединицами, содержится в сыворотке крови, а также присутствует в виде нерастворимых агрегатов в соединительной ткани. Его субъединицы содержат одну полипептидную цепь и соединены в С-концевом районе дисульфидными связями. Полипептидная цепь каждой из них образует последовательно целый ряд доменов, которым соответствуют сходные участки полипептидной цепи — своего рода повторы, которые могут быть отнесены к трем различным типам. Интересно, что аналогичные повторы (и, следовательно, домены аналогичного строения) присутствуют в других белках иной функции. Так, повторы типа I структурно близки одному из доменов тканевого активатора плазминагена.

Отдельные участки последовательности фибронектина, видимо, домены или их группы, функционально различны. Так, пять повторов типа I, охватывающих аминоконцевую последовательность фибронектина, направляют агрегацию его молекул, участвуют в образовании межклеточного матрикса, связываясь с гликозиламиногликаном — *гепарином* — огромной разветвленной молекулой, пронизывающей всю структуру межклеточного матрикса. Следующие шесть повторов (доменов), два из которых также принадлежат I типу, отвечают за взаимодействие с еще одним белком межклеточного матрикса — *коллагеном*.

Один из повторов типа III, расположенный в центральном участке полипептидной цепи и свернутый примерно так же, как домены иммуноглобулинов, образован семью β -структурными отрезками. Он содержит чрезвычайно характерную последовательность аминокислот Arg—Gly—Asp (RGD в однобуквенной записи). Эта последовательность, встречающаяся в несколько ином окружении и в некоторых других белках, например в тромбине, специфически связывается с рецептором

на поверхности клеток, так называемым *интегрином* $\alpha_5\beta_1$. Это обеспечивает адгезию клеток к фибронектину и играет важную роль в их ориентированном перемещении внутри соединительной ткани. Интересно, что сравнительно короткие пептиды, содержащие RGD-последовательность, имитируют способность фибронектина взаимодействовать с рецепторами на поверхности клеток.

Домены типа III, структурно близкие иммуноглобулину, встречаются и в других гигантских белках, например в белке мышц *титине* (молекулярная масса 3000 000 Да), где они, как полагают, придают полипептидной цепи способность к обратимому растяжению за счет обратимого перехода компактной пространственной структуры в развернутую и наоборот.

В фибронектине далее следуют домены, связывающие гепарин, и вблизи карбоксильного конца молекулы — связывающие фибрин. Расположенный на самом С-конце небольшой домен ответствен за антипараллельную ориентацию полипептидных цепей субъединиц и образование между ними двух дисульфидных связей.

Из сказанного видно, что фибронектин за счет соединения в весьма протяженной и гибкой структуре ряда функциональных доменов, настроенных на избирательное связывание — адгезию макромолекул и целых клеток, обеспечивает достаточно динамичную пространственную организацию межклеточного матрикса. Очевидно, что эта функция чрезвычайно важна в развитии соединительной ткани и организма в целом. Присутствующий в крови растворимый фибронектин играет ответственную структурообразующую роль в процессе заживления ран.

14.6. ЛАМИНИН

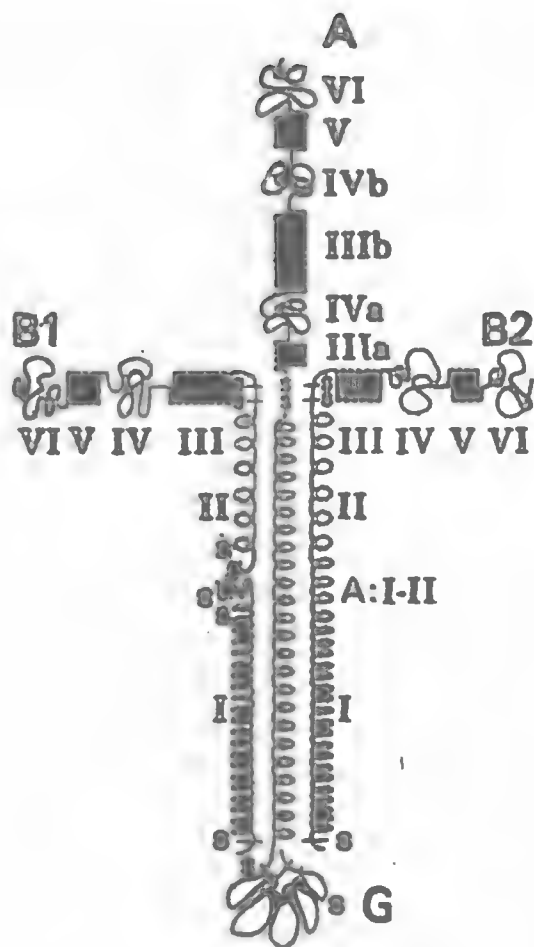
Ламинин — белок, участвующий в формировании внеклеточного матрикса и закреплении клеток, — образован очень длинными полипептидными цепями и по своей геометрии мог бы быть отнесен к фибриллярным белкам, однако довольно протяженные его участки представляют собой цепочки глобул небольшого размера, структурно сходных с одним из факторов роста. Таким образом, ламинин нельзя безоговорочно считать традиционным фибриллярным белком, хотя по контурам молекулы и функциональным свойствам между ними немало общего.

Этот гликопротеин с молекулярной массой около 900 000 Да является главным компонентом базальной мембраны, на которой формируется соединительная ткань. Известно несколько ламининов, отличающихся деталями структуры и локализацией в той или иной ткани,

Рис. 14.5. Структурная организация ламинина:

А, В1 и В2 - полипептидные цепи, С-концы которых находятся в нижней части рисунка. Направленные параллельно спиральные районы, по-видимому, образуют единую суперспираль. Один из ее участков ответствен за рост нейритов и адгезию нервных клеток. G - крупная глобула, образованная С-концевым районом А-цепи.

Римскими цифрами обозначены домены в полипептидных цепях ламинина. Домен III цепи В ответствен за связывание с рецептором на поверхности клетки и содержит последовательность Tyr Ile Ser Gly Arg. N-Концевые глобулярные домены цепей В1 и В2 связывают коллаген IV



так что речь идет о целом семействе структурообразующих полидоменных белков.

Ламинин связывается с коллагеном типа IV, характерным для базальной мембраны, протеогликаном — гепарансульфатом — и другими макромолекулами, в частности главным белком базальной мембраны *нидоген*, что приводит к формированию многокомпонентной сетчатой структуры — матрикса. Помимо того, ламинин обеспечивает связывание клеток эпителия с базальной мембраной. Ламинин (рис. 14.5) построен из трех полипептидных цепей: А-цепи (молекулярная масса 440 000 Да), В1-цепи (225 000 Да) и В2-цепи (205 000 Да). С-Концевые районы всех трех цепей могут образовывать весьма протяженные α -спирали, построенные из множества гептадных повторов, характерных для суперспирализованных белков, например, кератинов.

По-видимому, С-концевые α -спиральные районы всех трех цепей сплетены в единую весьма жесткую палочкообразную структуру — суперспираль длиной около 700–800 Å, которая завершается глобулой, построенной за счет выступающего С-концевого участка А-цепи. N-Концевая часть А-цепи формирует, вероятно, несколько доменов, включая так называемые цистеинбогатые участки, в которых примерно

на 50 аминокислот приходится 8 остатков цистеина. Эти домены структурно аналогичны фактору роста эпителия (EGF), имеют жесткую палочковидную структуру и, что примечательно, нередко обнаруживаются в структуре белков животных.

N-концевые участки цепей B1 и B2 как бы откинута в стороны от аналогичного участка цепи A, поэтому молекула ламинина приобретает форму креста, образованного тремя короткими отрезками и одним длинным, причем каждый из трех коротких лучей завершается двумя небольшими, а длинный — одной крупной глобулой. Центральная часть крестообразной структуры стабилизирована несколькими дисульфидными связями. N-Концевые участки легких цепей B1 и B2 также образуют по два глобулярных домена и жесткие палочковидные структуры, построенные аналогично фактору роста эпителия EGF.

В одном из таких EGF доменов цепи B1 находится участок узнавания рецептора ламинина, расположенного на поверхности клеток. Этот участок ответствен за адгезию клеток и их направленное перемещение. Характерно, что сравнительно короткий пентапептид — фрагмент последовательности в этом домене ламинина, имеющий строение Tyr—Ile—Gly—Ser—Arg, — способен конкурировать с ламинином за взаимодействие с клеточным рецептором и препятствовать адгезии клеток, в том числе, например, клеток меланомы базальной мембраной. Связывание коллагена IV, характерного компонента базальной мембраны, обеспечивается глобулами на коротких лучах креста, участок связывания нидогена (150 кДа) расположен в EGF-подобном домене цепи B2.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Общие руководства и учебные пособия

Страйер Л. Биохимия. — М.: Мир, 1984.

Уайт А., Хендлер Ф., Слейт Э. и др. Основы биохимии. — М.: Мир, 1981. Т. 1-3.

Лениндер А. Основы биохимии. — М.: Мир, 1985.

Осипов Ю. А. Бисорганическая химия. — М.: Просвещение, 1987.

К главе 1

Якубе Х. Д., Ешайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. — М.: Мир, 1985.

Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids/G.C. Barrett, ed. — London, N.Y.: Chapman and Hall, 1985.

К главе 2

Якубе Х. Д., Ешайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. — М.: Мир, 1985.

M. Bodansky. Peptide Chemistry. A. Practical Textbook. — N.Y.: Springer-Verlag, 1988.

К главе 3

Скоупс Р. Методы очистки белков. — М.: Мир, 1985.

Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и хроматография. — М.: Наука, 1981.

Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радионуклеотидными методами. — М.: Наука, 1983.

Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. — М.: Наука, 1985.

К главе 4

Практическая химия белка/Под ред. А. Дарбре. — М.: Мир, 1989.

К главе 5

- Шульц Г., Ширлер Р. Принципы структурной организации белков. — М.: Мир, 1982.
- Каптор Ч., Шиллел П. Биофизическая химия. — М.: Мир, 1984. Т. 1, 2; 1985. Т. 3.

К главе 6

- Каптор Ч., Шиллел П. Биофизическая химия. — М.: Мир, 1984. Т. 1.
- Шульц Г., Ширлер Р. Принципы структурной организации белков. — М.: Мир, 1982.

Карплус М., Ман-Каллон Дж. Э. Динамика белковой структуры // В мире науки. 1986. № 6. С. 4-15.

Chothia C. Principles that determine the structure of proteins // Ann. Rev. Biochem. 1984. V. 53. P. 537-572.

Pittsyan O.B. Protein Folding: Hypotheses and Experiments // J. Prot. Chem. 1987. V. 5. P. 273-293.

Privalov P.L. Stability of Proteins // Adv. Protein Chem. 1979. V. 33. P. 167-241; 1982. V. 35. P. 1-104.

Methods in Enzymology / C.H.W. Hirs, S.N. Timashev, Eds. — Enzyme structure. Academic Press, N.Y., London, 1986. V. 130. Part K; 1986. V. 131. Part L.

Gething M.-J., Sambrook K. Protein folding in the cell // Nature. 1992. V. 355. P. 33-45.

К главе 8

- Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. Основы биохимии. — М.: Мир, 1981. Т. 3.

К главе 9

Glazer A.N. The Chemical Modification of Proteins by Group-Specific and Site-Specific Reagents // The Proteins / Eds. H. Neurath, R.L. Hill. — N.Y., Academic Press, 1976. V. II. P. 1-103.

К главе 10

- Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. — М.: Мир, 1980.
- Дюга Э., Пенни К. Биоорганическая химия. — М.: Мир, 1983.
- Schultz G. The Interplay Between Chemistry and Biology in the Design of Enzymatic Catalyst // Science. 1988. V. 240. P. 426-433.

К главе 11

Methods in Enzymology, Posttranslational Modifications/F.Wold, K. Moldave, Eds. - Academic Press, N.Y., London, 1983. V. 106. Part A; 1984. V. 107. Part B.
Posttranslational Covalent Modifications of Proteins/B.C. Johnson, Ed. - Academic Press, N.Y., London, 1983.

К главе 12

Kaziro Y., Itoh H., Kozasa T. et al. Structure and Function of Signal-transducing GTP-binding Proteins//Ann, Rev. Biochem. 1991. V. 60. P. 349-400.

К главе 13

Иммунология/Под ред. У. Пол. - М.: Мир, 1987. Т. 1.

К главе 14

Фрейзер Р. Кератины/Молекулы и клетки. - М.: Мир, 1970. Вып. 5. С. 118-133.

- Абзины 249
- Аденилатциклаза 269, 290
- Аденозинмонофосфат циклический 269, 290
- Адренкортикотропный гормон (АКТГ) 38
- АДФ-Рибозилирование 271
- Азосочетание 188, 195, 196 *
- Активный центр фермента 207, 225, 226 *
- Аланин 9 *, 19
- Алкилборные кислоты 231
- Алкилирование карбоксильных групп 190
- тиоловых групп 192
- Алкогольдегидрогеназа 153, 240
- Аллостерические эффекторы 177
- Альбумин сывороточный 56
- Альдегид о-фталевый 15
- Альдегидопептиды 232
- Аль-лизин 306, 308, 309 *
- Аминогруппа(ы) аминокислот 8, 12-18
- защита при синтезе пептидов 25
- α -Аминогруппы 183
- ϵ -Аминогруппы лизина 183
- Аминокислотный анализ 62
- Аминокислоты 7-23
- амиды 16
 - аминокруппы 12-15
 - анализаторы автоматические 64
 - ароматические 69
 - ацетилирование 283
 - ацилирование 12
 - белковые 7
 - гидразиды 73
 - гидрофильные 8, 108
 - гидрофобные 7, 69, 73, 108
 - дабсил-производные 64 *
 - доступность боковых цепей для воды 109 *, 110 *
 - защищенные, симметричные ангидриды 30
 - инвариантные 144
 - карбоксильные группы 15-18
 - кислотно-основные свойства 8
 - С-концевые, определение 73
 - N-концевые, определение 74
 - небелковые 7
 - реакции с металлами 16
 - химические 12
 - синтез 18-23
 - эфиры 16
- Аминолиз α -галоидкарбоновых кислот 19
- Аминопептидазы 283
- Аминотрансферазы 205
- ВОС-ангидрид 26, 30 *, 32 *
- Ангидриды дикарбоновых кислот, модификация аминокрупп лизина 156-157 *
- Анемия серповидно-клеточная 180
- Аниониты 48
- Антибиотики пептидные 37
- Антиген(ы) 292, 295 *
- зона связывания 297
 - центр связывания 295, 297, 298 *

*Звездочкой отмечены страницы, на которых помещены рисунки, таблицы или формулы.

- Антитела каталитические 249-251 *
- моноклональные 57, 294, 298, 299 *
- поликлональные 57
- Антрахинонового ряда красители 55
- Апоферменты 204
- Аргинин 8, 9 *
- модификация 196
- Аргининянтарная кислота 7
- Арены 201, 202 *
- Арилирование 13, 185
- Аспарагин 8, 9 *, 63
- Аспарагиновая кислота 8, 9 *, 63
- выщепление остатков 71
- полуальдегид 7
- синтез 22
- Аспартат 35, 36 *
- Аспартаткарбамилтрансфераза 162 *
- Атерокальцин 259
- Аутокаталитическая реакция 280
- Аутофосфорилирование 285
- Аффинной хроматографии метод 52
- Аффинные реагенты 199
- N-Ацетилгалактозамин 262 *
- N-Ацетилглюкозамин 260
- Ацетилимидазол 186
- Ацетилкоэнзим А 283
- Ацетилтрансфераза 283
- Ацилаза L-аминокислот 20, 21 *
- O-Ацилмочевина 28, 29 *
- Ацилфермент 229
- NO-Ацильная миграция 255
- Бактериородопсин, ренатурация 138
- Белковой молекулы динамика 114-116 *
- уровни организации 60
- Белковые кристаллы 117
- Белок(ки), активностью управление 161
- аминокислотного состава определение 64
- Бенс-Джонса 295
- взаимодействие с водой 106, 107
- внутримолекулярные перегруппировки 254
- выделение 39-58
- гель-хроматография 43
- гетеромерные 150
- гидратация 8
- гликозилирование 259
- глобулярные, поверхность, структура, форма 113, 114
- гомогенность 39, 61
- гомомерные 151
- денатурация 127
- единицы свертывания 122
- мембранные 124-126 *
- интегральные 124
- ренатурация 138
- методы разделения 51
- микрогетерогенность 62
- множественные формы 152, 254
- модификация котрансляционная 253
- посттрансляционная 253
- определение 59
- паутины 314
- пентамерные 151
- первичной и вторичной структур соотношение 99
- полусинтез 34
- полярные группы 106
- пространственная структура 117
- формирование 99
- "растрепанные концы" 62
- самосборка 60
- GTP-связывающие 283
- "со свиными хвостиками" 272
- теплового шока 140
- тепловые колебания 116
- тетрамерные 151, 152 *
- тримерные 151
- фибриллярные 302
- физико-химические особенности 42
- фосфорилирование 266

- функциональных групп реакционная способность 181-183
- "химерный" 57
- C-H-гас 284, 285 *
- G-Белки 283
- Бензилоксикарбонилхлорид 25, 26 *
- Бензилоксикарбонильная группа 25
- Биполярные ионы 8, 24
- Бифункциональные сшивающие реагенты 200
- СААХ-Бокс 276
- Бора эффект 178
- Бромциан 52, 70

- Вазопрессин 38
- Валин 10 *
- Ван-дер-ваальсовы связи 104
- Взаимодействия нековалентные 103
- Вода, влияние на белок 87
- Водородные связи 8, 86, 103, 105 *, 106 *, 153
- Вторичная структура 79-102, 122
 - водородные связи 86
 - мерцающая 99
 - нерегулярные элементы 80
 - оптические методы определения 101, 102
 - регулярные элементы 80
 - устойчивость 98
- β -Галактозидаза 58
- Гель-хроматография 43
- Гем 162, 163 *
- Гепарин 315
- Геранил-геранил-пирофосфат 275 *
- Геранил-пирофосфат 275 *
- Гетеродимеры 161
- Гемоглобин(ы) 163, 167-180
 - A 179
 - F (фетальный) 177
 - R 174, 175
 - S 180
- T 174, 175
- аномальные 179-180
- Бостон 179
- Вена 179
- гистидин дистальный 165, 166 *
- - проксимальный 165, 166 *, 171
- релаксация молекулы 173
- Саскатун 179
- транспорт CO₂ и H₂ 177
- Хаммерсмит 179
- четвертичная структура 168, 169 *, 172 *
- - - кооперативность 170
- - - функциональная роль 173
- Гидантоин 19, 20 *
- Гидразиолиз пептидов 73
- Гидролазы 205, 233
- Гидрофобное ядро белка 108, 111 *, 113, 164
- Гидрофобность аминокислот, способы оценки 107
- Гидрофобные контакты 107, 154
- Гидрофобный гребень α -спирали 90
- Гипервариабельные петли иммуноглобулинов 297 *, 298 *
- Гистидин 8, 9 *
 - алкилирование 195
 - модификация 195
- Гистидиндекарбоксилаза 255
- Гликогенсинтетаза 267, 269 *
- Гликогенфосфорилаза 269 *
- N-Гликозидная связь 260
- O-Гликозидная связь 262, 263 *
- Гликозилирование белков 259
- Гликолипиды 272, 273 *
- Гликопротеины 259-265
 - функциональная роль углеводных компонентов 263, 264 *
- Глицеральдегидфосфат 246 *
- Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа 95 *
- Глицин 8, 9 *

- нестандартная конформация 84, 85 *
- Глобины 162-163
- типы 163
- Глобула расплавленная 137
- Глутамин 8, 9 *, 63
- Глутаминовая кислота 8, 9 *, 63
- Глутаровый диальдегид 202
- Глутатионредуктаза 97 *
- Голоферменты 204
- Гомодимеры 161
- Гомосерин 7, 71, 78 *
- Гомосериндегидрогеназа 22
- Грамицидин S 37, 54
- Гмос-Группа 26, 27 *
- Гуанидин солянокислый 129, 132, 133 *, 138, 156
- Гуанидогруппы аргинина модификация 196, 197 *
- Дальние взаимодействия в белках 99
- Дансирование 12
- Дансилхлорид 12 *, 75
- Дансильный метод 75
- Двойных обратных величин метод 212, 213 *
- Дегидроаланин 40, 256
- Дегидрогеназа 205
- Дегидрофолатредуктаза 58
- Дезамидирование 132
- Дезоксигемоглобин 170-172 *, 175
- Денатурация 40, 65, 127
 - тепловая 104
 - факторы 128-132
- Десмозин 312
- Десорбция белков при хроматографии 47, 50, 51 *
- Детергенты ионные 130
- Диазосоединения алифатические 190
- Диодитиозин 187 *, 257 *
- Дикетопиперазин 24, 25 *
- Дикумарин 259
- Димер(ы) 151, 169
- Диметилаллил-пирофосфат 275 *
- Динитрофенилирование 13, 74
- Динитрофторбензол 13 *, 74, 185 *
- Диоксиацетонфосфат 246 *, 247
- Дипольный момент α -спирали 90
- Дисперсии оптического вращения
 - метод 101
- Дисульфидного обмена реакция 193
- Дисульфидные мостики (связи) 8, 111
- Дитиоэритрит 133
- Дифосфоглицерат 175, 176 *
- Дифтаמיד 272
- Дифтерийный токсин 272
- Диэтиламиноэтил (ДЕАЕ)-целлюлоза 48
- Додецилсульфат натрия 130, 157
- Домены 118-120 *
 - иммуноглобулинов переменные 294, 295 *
 - - константные 294, 295 *
 - разделение 279
- Зимогены 280
- β -Изгиб 96-98 *, 135, 263
- Изолейцин 9 *
- Изомеразы 206
- Изопентенил-пирофосфат 275 *
- Изопептидные связи 23
- Изоформы белков 152
- Изоэлектрическая точка 11 *
- Иммобилизация белков 202
- Иммуноглобулин(ы) 56, 292
 - антигенсвязывающий участок 299 *
 - классы 302
 - многообразие 301
 - сегментная гибкость 296
 - G 293, 294 *
- Иммунодефицита человека вируса протеиназа 34
- Иммуносорбция 56
- Ингибирование ферментов 215

- конкурентное 217
- неконкурентное 218
- необратимое 215
- обратимое 217
- Ингибиторы сериновых протеиназ 231, 232
- Инсулин 34, 36 *, 149, 277
- Интегрин 316
- Интерлейкин 34
- Интерфероны 34
- Иодирование 186
- Ионы биполярные 8, 24
- Калликреин 224
- Кальмодулин 269
- Кальцитонин 34
- Карбамилирование 131
- Карбаминовая кислота 178
- Карбангидраза 203
- Карбобензооксигруппа 25
- Карбодиимиды 28, 29 *, 189
- N-Карбоксиангидриды 17
- γ -Карбоксиглутаминовая кислота 258
- Карбоксильная(ые) группа(ы) 8
 - активация 28
 - аспарагиновой и глутаминовой кислот 188
 - защита 16
- S-Карбоксиметилцистеин 66 *
- Карбоксипептидазы 54, 73, 74, 182, 220
- Карбониевый ион 236
- Катализ ферментативный 207
- Катализаторы биологические 203
- Катепсин D 265
- Катиониты 46, 48
- Кератин 311, 312 *
- Киназы 205
- Коллаген 302, 305 *, 307 *, 315
 - температура плавления 305
 - тройная спираль 304 *, 307 *
- Коллагеновые волокна 306, 307 *

- Конденсация альдольная 310
- кротоновая 308
- Конканавалин А 149
- Консервативные замены 164
- Константа диссоциации субстрата 209
 - ингибирования 216
 - Михаэлиса 209
 - "кажущаяся" 217
 - физический смысл 212
 - скорости бимолекулярная 211, 214
- Конформации стабильные 85 *, 86
- C-Концевой (аминокислотный) остаток 24
- N-Концевой (аминокислотный) остаток 24
- Кооперативная система нековалентных взаимодействий 154
- Кринглы 119
- Лактатдегидрогеназа 152, 243
 - каталитический центр 244 *
 - субстрат 244
- Ламинин 316, 317 *
- Латирин 309
- Легглобин 162
- Лейцин 9 *
- Лейциновые молнии 156, 314
- Лиазы 206, 256
- Лигазы 206
- Лиганды 53, 293
- Лизин 8, 9 *, 21
- Лизина лактам 21
 - синтез 22, 23
- Лизинлактамаза 21
- Лизиноаланин 40, 41 *
- Лизиноксидаза 306, 309, 311
- Лизинонорлейцин 306, 308 *
- Лизоцим 233, 234 *
 - механизм действия 237 *, 239
- Липопротеины 272
- β -Листы 136
 - упаковка 121

- Лъдоподобные структуры в воде 100
 Малатдегидрогеназа 243
 Межсубъединичные контакты 153
 Меланоцитостимулирующий гормон 38
 Меркаптоуксусная кислота 132
 Меркаптоэтанол 65, 66 *, 132, 137
 Металлопротеиназа 54, 69
 Метионин 9 *, 19, 63, 64 *
 - модификация 191
 Метионинсульфоксид 191
 Метионинсульфон 63, 64 *, 191
 Миоглобин 163-165 *, 167 *
 Миристоилирование 273
 Михаэлиса комплекс 207, 208
 Моделирования молекулярно-дина-
 мического метод 116
 Модификации аминокислот реагенты
 183-198
 Модификация аффинная 183
 Модифицирование химическое 180
 Fv-Модуль в иммуноглобулине 295
 Моноидтирозин 187
 Мочевина 132, 133 *, 137, 156
 Муреин 233 *
 Мутагенез сайт-специфический 134,
 180, 198, 232, 237
 Муцины 263
 Нековалентные взаимодействия в
 белке 90, 153
 - - во вторичной структуре 86
 Нидоген 317
 Нингидрин 14
 - цветная реакция с аминокислотами
 64
 Нитрование 187
 o-Нитротирозин 187 *
 Носители макропористые 46
 Оборотов число 214
 Овокальцин 259
 Оксиаминокислота 262
 Оксиянионная впадина 228-230 *
 Оксигемоглобин 170-172 *
 Оксидаза 205
 Оксидоредуктазы 205
 Оксипролин 303-305 *, 310
 N-Оксисукцинимид 29 *
 Окситоцин 38
 Оксониевый ион 236
 Олигосахаридтрансфераза 262
 Омыления реакция 16
 Онкобелки 271, 284
 Онкоген 287
 Остеокальцин 259
 Паули реакция 188, 196
 Пентафторфенол 29 *
 Пепсиноген 282
 Пептид(ы) 23
 - активационный 280
 - способы получения 34
 - определение первичной структуры
 73, 74
 - предшественники регуляторных
 пептидов 38
 - природные 36
 - свойства 24
 - синтез ферментативный 36
 - - твердофазный метод 32
 - - химический 25
 Пептидилбромметилкетоны 200
 Пептидная связь 23, 80, 81
 - - образование 28
 - - расщепление 70
 - - *цис, транс* 81 *-83
 - - - изомераза 139
 Пептидные петли, роль в нековалент-
 ных взаимодействиях 155, 156
 Первичная(ые) структура(ы) 59-79,
 141
 - - методы определения 65
 - - эволюционно отобранные 141
 - последовательности, задающие
 повороты пептидной цепи 144

Полиакриламид 43
 Полибелки 59, 158
 - разделение 278
 Полипептиды 23
 Полипептидная цепь неупорядоченная 65
 -- пути свертывания 134-136 *
 RCD-Последовательность 315
 Посттрансляционной модификации реакции 7
 Пренилирования реакция 274
 Пренилтрансфераза 276
 Проинсулин 35, 278
 Прокарбоксипептидаза 282
 Проколлаген 306
 Проколлагенпептидаза 306
 Пролин 10 *, 310
 Протетическая группа 162
 Пространственная структура белка, связь с первичной структурой 141
 Протеиназа(ы) 205
 - аспартильные 258
 - сериновые 68, 69, 220
 -- активный центр 225, 226 *
 -- катализ 225
 -- механизм действия 227 *, 228, 231
 - системы свертывания крови, механизм действия 281-282
 Протеиндисульфидизомераза 138, 139 *
 Протеинкиназы 150, 265
 - специфичность вторичная 67
 -- первичная 67
 Протеогликаны 259
 Протеолиз глубокий 276
 - ограниченный 276, 277
 Протоонкобелки 284
 Протоонкоген 287
 Проферментов активация 280
 -- биологический смысл 282
 Процессинг 60, 253, 260
 328

Районы иммуноглобулинов, определяющие комплементарность 298
 Рамачандрана карта 84, 85 *, 91, 96, 97 *
 "Растрепанные концы" 282
 Рацемазы 21, 206
 Рацематы аминокислот 20
 -- способ разделения 20
 Рацемизация 31
 Резус-фактора белок 274
 Ренатурация белка 132
 - кинетика 133 *-136
 Ретровирусы 279
 РНК-полимераза 151
 Росттрансформирующий фактор α 33
 Руеманна фиолетовый 14 *
 Связь ионная 16
 - координационная 16
 Секвенатор(ы) автоматический(е) 77
 - газофазный 79
 Серин 8, 9 *, 103 *
 Серицин 314
 Сефадекс 43
 Сефароза 43, 50, 52
 Сиаловая кислота 265
 Синтез белков *de novo* 148
 Синтетазы 206
 β -Складчатые листы 93, 153
 β -Складчатого слоя формирование 155
 β -Слой 93, 94 *
 Соединения включения 106
 α -Спираль(и) 80, 88, 97 *, 123, 136 *
 - амфифильная 91
 - гидрофобная 91
 - гребни 121
 - левая 85 *, 88, 97 *
 - нековалентные взаимодействия 155
 - правая 85 *, 88, 89 *
 - упаковка 121, 122
 Специфичность ферментов
 субстратная 205

Сплайсинг альтернативный 290
Стереοизбирательность реакции 22
Стереοхимического кода выра-
женность 147

Стресс-белки 140
 β -Структура 80, 91, 96 *, 97 *
- антипараллельная 85 *, 86, 92-93 *,
314
- нерегулярная 80
- параллельная 85 *, 86, 91 *, 92
- регулярная 80

β -Структурных отрезков взаимо-
действие 155

Субтилизины 220

Субстрата связывание 220

Субъединицы, зона контакта 161, 162 *

Сульфгидрильных групп окисление
193

Сульфопропилсефадекс 48

Сульфоцистеин 66 *

Супервторичная структура 94

Тауомеразы 206

Тела включения 137

Термолизин 69

Тиоредоксин 138, 139

Тиреоглобулин 256, 257 *

Тирозин 10 *, 187 *, 188 *

- иодирование 256

Тирозинкиназы 270

Тироксин 257 *

Титин 316

Тойоперл 43

Токсинов белковых механиз-
действия 279

Трансаминазы 205

Трансдуцин 288, 289 *

Трансферазы 205

Треонин 8, 9 *

Трет-бутиловые эфиры 16, 26, 28 *

Трет-бутоксикарбонильная группа
26

Третичная структура белка 88, 94,
101-148, 155

--- дестабилизация 107

--- образование из элементов
вторичной структуры 121

--- перенос эффекта на значительные
расстояния 173

--- стабильность 103

Трикетогидриндегидрат 14

Триозофосфатизомераза 246

- каталитический центр 246 *

Трипсин 68, 224 *, 280

- ингибитор 34

- электростатическое взаимодействие
68

Трипсиноген 280

Триптофан 10 *

- модификация 197

Тропоколлаген 304, 306

Тропоэластин 311

Туникамицин 262

Уравнение Михаэлиса - Ментен 208-
211

Фактор роста эпителия 34

Фарнезил-пирофосфат 275 *

Фотоактивируемая фенилазидная
группировка 201

Фенилаланин 9 *, 15, 20, 22

Фенилизотиоцианат 17, 75

Фенилсефароза 50 *

Фенилтиазолинон 76

Фенилтиогидантоин 18

Фенилгидантоиновый метод 75, 76 *

Фенилтиокарбамил-аминокислота 17,
18 *

Фенольные группы тирозина, модифи-
кация 186

Фермент-субстратный комплекс 207,
208 *, 226

-- переходный, модель 221

Ферменты 203-253
- ингибирование 215
- катализ 207
-- кинетика 208
- международная классификация 205
- механизм действия 242
- предшественников активация 280
- протеолитические 41
- систематика 204
Ферритиноглобин 167
Фиброин шелка 314
Фибронектин 315
Флуоренилметилоксикарбонильная группа 26
Формилаза 282
Фосген 17
Фосфодиэстераза 269
Фосфопротеинфосфатазы 267-269 *
Фосфопротеины 266
Фосфорилазы 266-268
- активация 267
Фосфорилирование белков 266
Фрагмент антигенсвязывающий иммуноглобулина 296
Fab'-Фрагмент 295
(Fab)₂-Фрагменты 296
Fc-Фрагмент 295

Химотрипсин 69, 220
Химотрипсиноген 281
Хелатные структуры 17
Хроматография аффинная 52
- жидкостная 34
-- быстрая (FPLC), метод 50
-- высокоэффективная (ВЭЖХ) 72
- гидрофобная 50
- ионнообменная, метод 46, 49 *
Хромофоры 101

Цвиттер-ионы 8
Циклоизомеразы 206

Циклопептиды 37
Циклоспорин 37, 140
Циклофилин 140
Цистеин 8, 9 *, 63 *, 192 *
- модификация 192
Цистеиновая кислота 63 *
Цистин 8, 63 *
Цис, транс-изомеризация пептидной связи 139

Четвертичная структура 149-162
-- анализ функциональной роли 158-162
-- кооперативные эффекты 177
-- способы мягкой диссоциации 156
-- стехиометрии определение 150, 158,

Шаперонины 141
Шапероны 140
Шарнирный участок в иммуноглобулинах 296
Шиффа основание 13, 14 *, 185, 306 *

Экзоны 310
Экзопептидазы 73
Эластин 310
Электростатические контакты 104
Эльмана реактив 193, 194 *
Эндопротеиназы 69
Энзимы 204
Энкефалины 38, 39 *
Энтеропептидаза 58, 280
Эпитоп 298, 300
Эстеразы 206
Эфиры активированные 29

Ядерного магнитного резонанса метод 118, 136 *

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Введение	5
Глава 1. Аминокислоты	7
1.1. Кислотно-основные свойства аминокислот	8
1.2. Химические реакции α -аминокислот	12
1.2.1. Реакции аминогрупп	12
1.2.2. Реакции карбоксильных групп	15
1.2.3. Реакции с совместным участием α -аминной и α -карбоксильной групп	16
1.3. Методы синтеза α -аминокислот	18
1.3.1. Химический синтез	18
1.3.2. Разделение рацемических аминокислот	20
1.3.3. Ферментативный синтез аминокислот	22
1.3.4. Микробиологический синтез аминокислот	22
Глава 2. Пептиды	23
2.1. Химические свойства пептидов	24
2.2. Химический синтез пептидов	25
2.2.1. Защита аминогруппы	25
2.2.2. Защита α -карбоксильной группы	28
2.2.3. Образование пептидной связи	28
2.2.4. Тактика пептидного синтеза	31
2.3. Ферментативный синтез пептидов	35
2.4. Природные пептиды	36
Глава 3. Выделение белков	39
3.1. Особенности выделения белков	40
3.2. Характерные свойства белков, на которых основано их разделение	42
3.3. Разделение белков по молекулярной массе. Гель-хроматография (гель-фильтрация)	43
3.4. Ионообменная хроматография белков	46

3.5. Гидрофобная хроматография белков	50
3.6. Аффинная, или биоспецифическая, хроматография белков	51
3.7. Иммуносорбция	56
3.8. Перспективы использования белковой инженерии для выделения белков.....	57
Глава 4. Первичная структура белка	59
4.1. Первичная структура как уровень организации белка	59
4.2. Доказательство индивидуальности белка. Микрогетерогенность белков	61
4.3. Определение аминокислотного состава белка	62
4.4. Методы определения первичной структуры	65
4.4.1. Подготовка белка к анализу	65
4.4.2. Ферментативные методы фрагментации полипептидной цепи	67
4.4.3. Химические методы специфического расщепления пептидных связей	70
4.4.4. Разделение пептидов, полученных фрагментацией полипептидной цепи	72
4.5. Определение первичной структуры пептидов	73
4.5.1. Определение С-концевых аминокислот	73
4.5.2. Определение N-концевых аминокислот и последовательностей	74
Глава 5. Вторичная структура	79
5.1. Структурные особенности пептидной связи	80
5.2. Стерические ограничения и вторичная структура пептидной цепи	83
5.3. Роль водородных связей в формировании вторичной структуры	86
5.4. α -Спираль	88
5.5. β -Структура	91
5.6. β -Изгиб	96
5.7. Об устойчивости вторичной структуры	98
5.8. О соотношении между первичной и вторичной структурами	99
5.9. Оптические методы изучения вторичной структуры	101
Глава 6. Третичная структура белка	102
6.1. Стабильность пространственной структуры белка	103
6.2. Гидрофобное ядро	108
6.3. Роль дисульфидных связей в стабилизации третичной структуры некоторых белков	111

6.4. Форма, компактность и динамика молекулы белка	113
6.5. Особенности рентгеноструктурного анализа как главного источника информации о пространственной структуре белка	117
6.6. Домены в белках	118
6.7. Образование третичной структуры белка из элементов вторичной структуры	121
6.8. Топология полипептидных цепей в белках и классификация пространственных структур	122
6.9. Особенности структуры мембранных белков	124
6.10. Денатурация белка	127
6.11. Ренатурация белка	132
6.12. О соотношении между первичной и пространственными структурами белка	141
Глава 7. Четвертичная структура белка	148
7.1. Стехиометрия и геометрия четвертичной структуры	150
7.2. Взаимодействия между субъединицами, стабилизирующие четвертичную структуру	153
7.3. Структурная организация контактов между субъединицами	155
7.4. Способы исследования четвертичной структуры	156
7.5. Функциональное значение четвертичной структуры белка	158
Глава 8. Глобины	162
8.1. Миоглобин	164
8.2. Гемоглобин	167
8.2.1. Четвертичная структура гемоглобина	168
8.2.2. Присоединение кислорода к гемоглобину и сопровождающие его изменения третичной структуры	170
8.2.3. Функциональная роль четвертичной структуры гемоглобина	173
8.2.4. 2,3-Дифосфоглицерат - эффектор, регулирующий функцию гемоглобина	175
8.2.5. Участие гемоглобина в транспорте CO_2 и ионов водорода	177
8.2.6. Аномальные гемоглобины	179
Глава 9. Химическое модифицирование белков	180
9.1. Особенности метода химического модифицирования	181
9.2. Типовые реакции химической модификации функциональных групп белка	183
9.2.1. ϵ -Аминогруппы	183

9.2.2. Фенольные группы тирозина	186
9.2.3. Реакции карбоксильных групп	188
9.2.4. Модификация остатков метионина	191
9.2.5. Модификация остатков цистеина	192
9.2.6. Модификация имидазольной группы гистидина	195
9.2.7. Модификация гуанидогруппы аргинина	196
9.2.8. Модификация индола в триптофане	197
9.3. Области применения метода химического модифицирования	198
9.3.1. Химическое модифицирование как способ выявления роли функциональных групп белка	198
9.3.2. Аффинные реагенты	199
9.3.3. Химическое модифицирование в изучении межмолекулярных комплексов и синтезе конъюгатов белков	200
9.3.4. Другие области применения химического модифицирования белков	202
Глава 10. Ферменты	203
10.1. Систематика ферментов	204
10.2. Общие понятия ферментативного катализа	207
10.3. Основные положения кинетики ферментативного катализа	208
10.4. Ингибирование ферментов	215
10.5. Сериновые протеиназы	220
10.5.1. Связывание субстрата	220
10.5.2. Каталитический механизм	225
10.6. Лизоцим	233
10.7. Алкогольдегидрогеназа	240
10.8. Лактатдегидрогеназа	243
10.9. Триозофосфатизомераза	246
10.10. Каталитические антитела ("абзимы")	249
Глава 11. Посттрансляционная модификация белка	253
11.1. Внутримолекулярные перегруппировки в белках	254
11.2. Иодирование остатков тирозина	256
11.3. Образование остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты	258
11.4. Гликозилирование белков. Гликопротеины	259
11.4.1. N-Гликопротеины	260
11.4.2. O-Гликопротеины	262
11.5. Фосфорилирование белков. Фосфопротеины	266
11.6. ADP-рибозилирование	271
11.7. Липопротеины	272

11.7.1. Липопротеины с С-концевым гликолипидом	272
11.7.2. Липопротеины с N-концевой липидной группировкой	273
11.7.3. Пренилированные белки	274
11.8. Ограниченный протеолиз	276
11.8.1. Формирование белка неканонической структуры. Биосинтез ин- сулина	277
11.8.2. Разъединение белковых глобул в полибелках	278
11.8.3. Разделение доменов	279
11.8.4. Активация предшественников ферментов	280
11.9. Процессинг аминоконцевого района белка	282
Глава 12. G-белки	283
12.1. Белок с-H-gas	284
12.2. Трансдуцин	288
12.3. Стимулирующий белок G _s и ингибирующий белок G _i аденилат- циклазной системы	290
Глава 13. Иммуноглобулины	292
13.1. Молекулярная организация иммуноглобулина G	293
13.2. Центр связывания антигенов	297
13.3. Многообразие иммуноглобулинов	301
Глава 14. Фибриллярные белки	302
14.1. Коллаген	302
14.2. Эластин	310
14.3. Кератины	311
14.4. Фиброин шелка	314
14.5. Фибронектин	315
14.6. Ламинин	316
Рекомендуемая литература	319
Предметный указатель	322

Учебное издание

Степанов Валентин Михайлович

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ.
СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ**

Редактор *А.С. Орлова*. Художник *Ю.Г. Черепанов*. Художественный редактор *Е.А. Вишнякова*. Технические редакторы *Е.И. Герасимова*, *Л.А. Овчинникова*. Корректор *Г.И. Кострикова*. Оператор *В.Н. Дулбар*

ИБ № 9592

ЛР № 010146 от. 15.12.91. Изд. № Х/Е-77. Сдано в набор 13.12.93.
Подп. в печать 16.01.96. Формат 60x88¹/₁₆. Бум. газетн.
Гарнитура "Русская". Печать офсетная. Объем 20,58 усл. печ. л.
20,58 усл.кр.-отт. 21,35 уч.изд.л. Тираж 5000 экз. Зак. №56

Издательство "Высшая школа", 101430, Москва, ГСП-4,
Неглинная ул, д. 29/14.

Набрано на персональном компьютере издательства.

Отпечатано в АООТ "Оригинал", 101898, Москва, Центр,
Хохловский пер. 7.